

# **DNA-Reparatur und Apoptose in Thymozyten**

## ***lck-PARP-DBD* transgener Mäuse**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Bio- und Geowissenschaften  
der Universität-Gesamthochschule Essen  
vorgelegt von

Ralph Beneke

aus Zeven

9. Dezember 1999

Die der nachfolgenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie der Universität GH Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Möröy

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Horsthemke

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. G. Obe

Tag der mündlichen Prüfung:

# **INHALTSVERZEICHNIS**

## **ABKÜRZUNGEN**

<b>EINLEITUNG</b>	1-18
1) Poly(ADP-Ribose)-Polymerase	1-2
2) Metabolismus des ADP-Ribose-Polymers	2-3
3) Interaktion mit anderen Proteinen und biologische Funktionen	4-12
3.1) Histone	5-6
3.2) DNA-Reparatur	6-8
3.3) Transkription und Replikation	8-9
3.4) Apoptose	9-12
3.5) Nekrose	12-13
4) Maus <i>in vivo</i> -Modelle	13-16
4.1) Bcl-2 als Onkogen	13-14
4.2) p53 als Tumorsuppressorgen	15-16
4.3) Poly(ADP-Ribose) in PARP-defizienten Mäusen	16-17
5) Zielsetzung	17-18

<b>ERGEBNISSE</b>	19-37
1) Expression des <i>lck-PARP-DBD</i> Transgenkonstruktes	19-26
1.1) Das <i>lck-PARP-DBD</i> Transgenkonstrukt	19-20
1.2) Etablierung <i>lck-PARP-DBD</i> transgener Mauslinien	20-21
1.3) Expression der PARP-DBD in T-Zellen	21-22
1.4) Entwicklung und Aktivierung von PARP-DBD exprimierenden T-Zellen	22-24
1.5) Überexpression der PARP-DBD inhibiert ADP-Ribose-Polymerbildung	24-25
1.6) Spontane und durch Dexamethason induzierte Apoptose in Thymozyten	25-26
2) PARP-DBD beschleunigt Apoptose nach genotoxischem Stress	26-28

4) Kreuzung <i>lck-PARP-DBD</i> transgener mit <i>p53</i> -defizienten Mäusen	30-36
4.1) Die Basen-Exzisions-Reparatur ist unabhängig von <i>p53</i>	30-31
4.2) Die DNA-Strangbruch induzierte Apoptose ist <i>p53</i> abhängig	31-32
4.3) Die PARP-Inhibierung beschleunigt die Akkumulation von <i>p53</i>	33-34
4.4) Die <i>p53</i> -Akkumulation korreliert mit verstärkter transkriptioneller Aktivität und erhöhter Bax-Expression	34-36
5) <i>lck-PARP-DBD</i> / $\mu$ - <i>Bcl-2</i> doppeltransgene Mäuse sind Apoptose resistent	36-37

## **DISKUSSION** 38-49

1) Das <i>lck-PARP-DBD</i> transgene Maussystem	39-40
2) Funktion von PARP und Poly(ADP-Ribose) bei der DNA-Exzisionsreparatur	41-43
3) Dominant negative PARP-DBD und Apoptose in Thymozyten	44-49

## **ZUSAMMENFASSUNG** 50-51

## **MATERIAL & METHODEN** 52-76

1) Puffer und Lösungen	52-57
2) Molekularbiologie	58-66
2.1) Verwendete Plasmide	58
2.2) Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung	58
2.3) Restriktionsverdau	58
2.4) Konversion überhängender DNA-Enden	59
2.5) Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden	59
2.6) Gelelektrophoretische DNA-Auftrennung	59-60
2.7) Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	60
2.8) Ligation	60
2.9) Herstellung kompetenter Bakterien	60-61
2.10) Transformation kompetenter Bakterien	61
2.11) Isolierung von Plasmid-DNA aus 3 ml-Kulturen	61
2.12) Isolierung von Plasmid-DNA aus 250 ml-Kulturen	61-62
2.13) DNA-Sequenzierung	62-63

2.14) Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	63
2.15) Präparation von Transgenkonstrukten für die Oozyten-Injektion	63-64
2.16) Präparation genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen	64
2.17) Restriktionsverdau genomischer DNA	64
2.18) Transfer von DNA auf Nylonmembranen	65
2.19) Herstellung radioaktiv markierter Sonden	65-66
2.20) Hybridisierung an immobilisierter DNA	66
2.21) Polymerasekettenreaktion („PCR“)	66
3) Proteine	67-79
3.1) Proteinextrakte aus Kulturzellen	67
3.2) Proteinbestimmung	67
3.3) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	67-68
3.4) Proteintransfer und immunologischer Nachweis	68-69
4) Zellkultur	69-76
4.1) Kultivierung von Zelllinien	69
4.2) Passagieren von Zelllinien	70
4.3) Einfrieren und Auftauen von Zellen	70
4.4) Elektroporation	70-71
4.5) Messung von Reportergenaktivität (Luziferase)	71
4.6) Herstellen einer Einzelzellsuspension	71
4.7) Röntgenbestrahlung von Einzelzellsuspensionen	71
4.8) Durchflusszytometrie	72
4.9) T-Zellaktivierung und 3H-Thymidineinbau	72-73
4.10) DNA-Fragmentierungsanalyse	73
4.11) Beschichtung von Deckgläsern	73-74
4.12) <i>In situ</i> -Immunfluoreszenz	74
4.13) „Comet assay“	74-76
4.13.1) Mikrogelelektrophorese	74-75
4.13.2) Kometen-Messung	75-76

<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	77-101
-----------------------------	--------

## **ABKÜRZUNGEN**

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation (Zelloberflächenmarker)
cDNA	copy DNA (Kopie-DNA)
CIP	Kälber (calf) intestinale Phosphatase
cpm	counts per minute (Ereignisse pro Minute)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxguanintriphosphat
DMEM	„Dulbecco´s modified eagles medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonikleinsäure (-acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (-acid)
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell (cell) Sortierer
FCS	Fötales Kälber (calf) Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
LB	Luri-Bertani
MMTB	mouse tail buffer (Mausschwanz-Puffer)
NLS	nuclear localisation signal (Kernlokalisierungssignal)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte (buffered) Salzlösung
PCD	programmed cell death (Programmierter Zelltod)

PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
SCE	sister chromatid exchange (Scwesterchromatid-Austausch)
SCID	severe combined immunodeficiency (schwere kombinierte Immundefizienz)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Citrat gepufferte Kochsalzlösung
STE	Tris gepufferte Kochsalz/EDTA-Lösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zellrezeptor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween 20	Polyethylensorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse (weight)/Volumen
z. B.	zum Beispiel

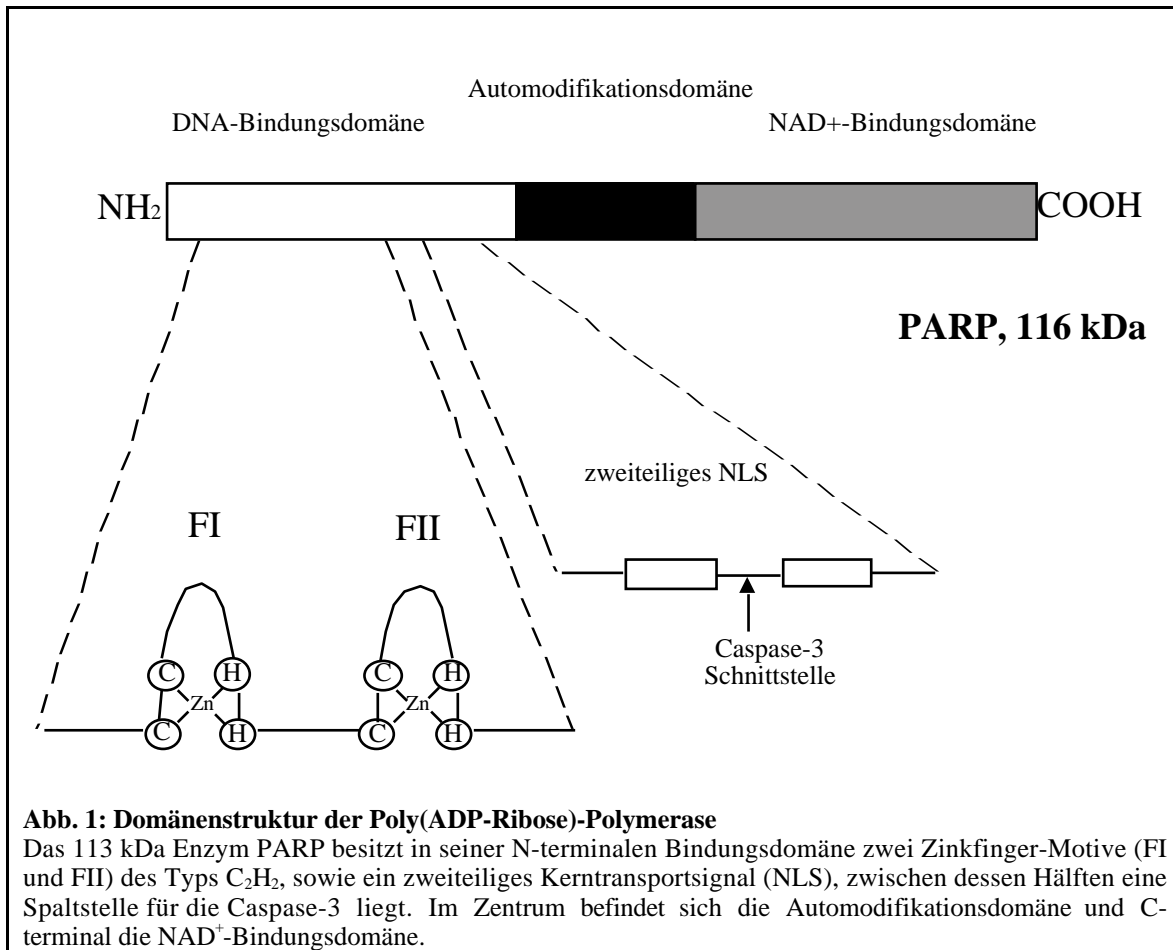
# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

Das nukleäre Protein Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) (EC 2.4.2.30) ist weit verbreitet innerhalb der Eukaryonten (mit Ausnahme der Hefe) und liegt - vor allem bei teilungsaktiven Zellen - in einer hohen Kopienzahl von  $10^5$  bis  $2 \times 10^6$  Molekülen pro Zelle vor (Ludwig *et al.*, 1988). Die Aminosäuresequenz und damit die Primärstruktur ist zwischen den verschiedenen Spezies stark konserviert (Huppi *et al.*, 1989; Thibodeau *et al.*, 1989; Beneke *et al.*, 1997; Cherney *et al.*, 1987; van Gool *et al.*, 1997). Zwischen der humanen und der murinen PARP besteht eine Übereinstimmung von 92 % über die gesamte Aminosäuresequenz. Die PARP aus *D. melanogaster* ist der des Menschen immer noch zu 61 % homolog (Uchida & Miwa 1994). Auch Pflanzen besitzen ein Poly(ADP-Ribosyl)-ierungssystem, wobei sich jedoch dessen zuerst entdecktes Enzym von dem der Säuger-PARP sehr deutlich unterscheidet (Chen *et al.*, 1994; Babiychuk *et al.*, 1998). Neueste Befunde weisen daraufhin, dass es im tierischen System eine ganze Familie von Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen gibt, was durch die Existenz der Tankyrase (Smith *et al.*, 1998) sowie durch das Vorhandensein von ADP-Ribose-Polymer in Zellen von PARP<sup>-/-</sup>-Mäusen (Shieh *et al.*, 1998) verdeutlicht wird. Das dafür vermutlich verantwortliche Enzym ist als PARP-2 kloniert worden (Amé *et al.*, 1999). Die "klassische" PARP-1 hat ein Molekulargewicht von 113 - 116 kDa und lässt sich in drei Domänen untergliedern (Abb. 1):

- 1.: Die N-terminale DNA-Bindungsdomäne (ca. 46 kDa) mit zwei Zinkfinger-Motiven (Gradwohl *et al.*, 1990; Ikejima *et al.*, 1990) und einem dazwischen gelegenen Kerntransportsignal (NLS) (Schreiber *et al.*, 1992),
- 2.: die Automodifikationsdomäne (ca. 22 kDa), an welche das entstehende ADP-Ribose-Polymer synthetisiert wird und
- 3.: die C-terminale NAD<sup>+</sup>-Bindungsdomäne (ca. 54 kDa) mit dem katalytischen Zentrum.





Die Poly(ADP-Ribosyl)-ierung von Proteinen im Zellkern ist eine der ersten, dramatischen Antworten der Zelle auf genotoxischen Stress (Lindahl *et al.*, 1995). Dabei wird PARP *in vivo* vor allem bei solchen Schäden aktiv, die durch das Basen-Exzisions-Reparatursystem erkannt und beseitigt werden (Sato & Lindahl, 1992; Sato *et al.*, 1993). PARP bindet an den Strangbruch der DNA und synthetisiert aus  $\beta$ - $NAD^+$  unter Abspaltung von Nikotinamid verzweigte Polymere aus ADP-Ribose-Einheiten (Althaus & Richter, 1987).

## 1.2 Metabolismus des ADP-Ribose-Polymers

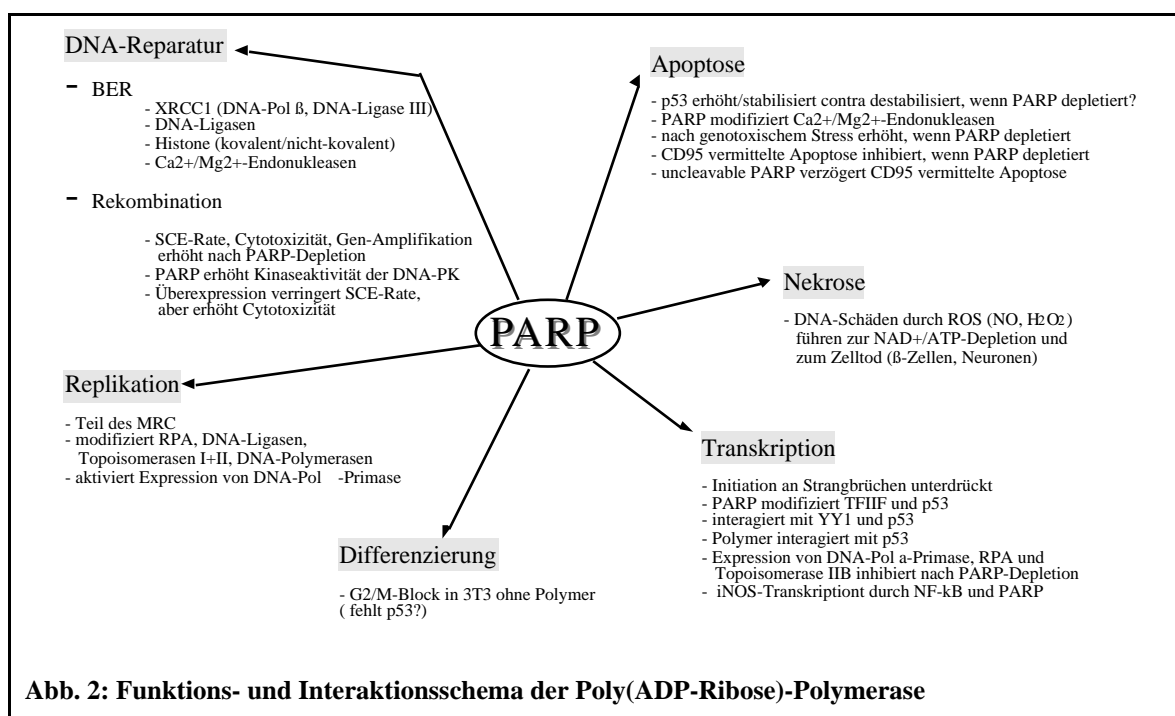
Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase erkennt mit ihren zwei Zinkfinger-Motiven DNA-Einzelstrang- und DNA-Doppelstrangbrüche, wobei der aminoterminal gelegene erste Zinkfinger Doppelstrangbrüche und der zweite Einzelstrangbrüche erkennt. Zusätzlich

ist der erste Zinkfinger essentiell für die katalytische Aktivierbarkeit der PARP durch beide Strangbruchtypen (*Ikejima et al., 1990*). PARP fungiert als katalytisches Dimer, d.h. je zwei Moleküle binden an einen Strangbruch (*Mendoza-Alvarez & Alvarez-Gonzalez, 1993*). Dabei werden 7 Nukleotide in die Protein-DNA-Wechselwirkung einbezogen (*Giner et al., 1992*) und die charakteristische V-Form der DNA nach einem Einzelstrangbruch stabilisiert (*LeCam et al., 1994*). Die Bindung ist sehr spezifisch und führt zu einer 500-fachen Erhöhung der basalen Aktivität des katalytischen Zentrums. Die dabei gebildete Poly(ADP-Ribose) ist ein O-glykosidisch verknüpftes Biopolymer (*Chambon et al., 1966*). Bei der Initiation wird eine ADP-Ribose-Einheit mit einem Aspartat- oder Glutamat-Rest eines Proteins verestert. Bis zu 200 weitere ADP-Ribose-Reste werden dann 1-2 glykosidisch angekoppelt. Ungefähr alle 40 Einheiten wird 1-2 glykosidisch eine zusätzliche ADP-Ribose-Einheit verknüpft, was zur Verzweigung des Polymers führt (*Kawaichi et al., 1981; Alvarez-Gonzalez, 1988; Naegli et al., 1989*). Wie die Termination reguliert wird, ist nicht genau bekannt. Es gibt aber Hinweise, dass Histone daran beteiligt sind (*Naegli & Althaus, 1991*). Der Hauptakzeptor für das Polymer ist PARP selbst (*Ogata et al., 1981; Adamietz, 1987*), wobei es sich um eine intermolekulare Modifizierung und nicht um eine Automodifizierung im eigentlichen Sinne handelt (*Mendoza-Alvarez & Alvarez-Gonzalez, 1993*).

PARP wird durch diese Modifikation wegen der hohen negativen Ladung des Polymers elektrostatisch von der DNA abgestoßen und wieder inaktiviert (*Durkacz et al., 1980; Ferro & Olivera, 1982; Zahradka & Ebisuzaki, 1982*). Der Abbau des Polymers durch Spaltung der O-glykosidischen Ribose-Ribose-Bindungen geschieht durch die Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) (*Braun et al., 1994*). Mit hoher Prozessivität wird langkettiges Substrat endoglykosidisch zu etwa 20-meren hydrolysiert. Kurze Reste werden nur sehr langsam abgespalten. ADP-Ribose-Protein-Lyase spaltet den letzten ADP-Ribose-Rest vom Akzeptorprotein ab.

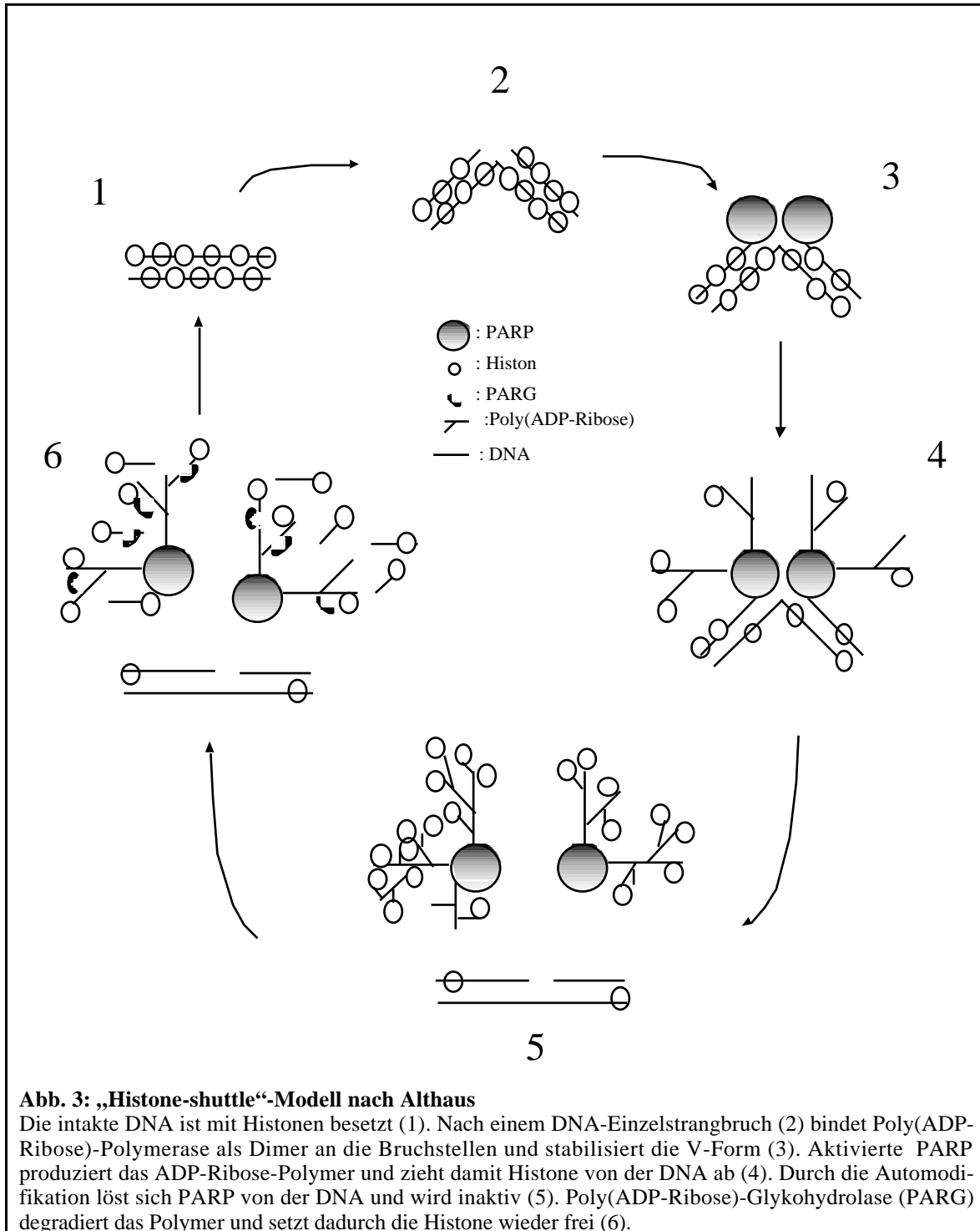
### 1.3 Interaktion mit anderen Proteinen und biologische Funktionen

Neben PARP als Hauptakzeptor für das ADP-Ribose-Polymer können auch andere nukleäre Proteine *in vitro* und z. T. *in vivo* kovalent modifiziert werden wie z. B. Histone (Adamietz & Rudolf, 1984), DNA-Ligasen (Creissen & Shall, 1982; Ohashi et al., 1983; Yoshihara et al., 1985), DNA-Polymerasen (Yoshihara et al., 1985; Eki, 1994), DNA-Topoisomerasen (Ferro et al., 1983; Darby et al., 1985; Scovassi et al., 1993), p53 (Weiserska-Gadek et al., 1996; Kumari et al., 1998), Endonukleasen (Yoshihara et al., 1975) und DNA abhängige Protein-Kinase (DNA-PK) (Ruscetti et al., 1998). Außerdem können Proteine auf nicht-kovalente Weise mit dem Polymer interagieren wie z. B. Histone (Panzeter et al., 1993) oder p53 (Malanger et al., 1998). Es sind aber auch direkte Wechselwirkungen von Proteinen mit PARP bekannt wie z. B. bei DNA-Polymerase (Simbulan et al. 1993; Dantzer et al., 1998), XRCC1 (Masson et al., 1998), DNA-PK (Weinfeld et al., 1997; Ruscetti et al., 1998) und p53 (Vaziri et al., 1997). Die untersuchten Wechselwirkungen haben unterschiedliche physiologische Funktionen z. B. bei der DNA-Reparatur und DNA-Replikation, bei der Transkription und Differenzierung, sowie bei der Apoptose und Nekrose (Abb. 2).



### 1.3.1 Histone

Histone, vor allem H1 und H2B, können von PARP kovalent modifiziert werden. Allerdings besitzen alle Histonproteine eine hohe Affinität zum Polymer (*Panzeter et al., 1993*).



**Abb. 3: „Histone-shuttle“-Modell nach Althaus**

Die intakte DNA ist mit Histonen besetzt (1). Nach einem DNA-Einzelstrangbruch (2) bindet Poly(ADP-Ribose)-Polymerase als Dimer an die Bruchstellen und stabilisiert die V-Form (3). Aktivierte PARP produziert das ADP-Ribose-Polymer und zieht damit Histone von der DNA ab (4). Durch die Automodifikation löst sich PARP von der DNA und wird inaktiv (5). Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) degradiert das Polymer und setzt dadurch die Histone wieder frei (6).

*In vitro*-Experimente konnten zeigen, dass Poly(ADP-Ribosyl)-ierung von Polynukleosomen die Chromatinstruktur relaxiert (*Poirier et al., 1982; de-Murcia et al., 1986; Da Capoa et al., 1999*). Die Aktivität der PARP bewirkt lokal eine reversible Auflockerung des Chromatins. Diese und weitere Beobachtungen führten zu einem Funktionsmodell der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase als Histon-shuttle, bei dem in der Umgebung eines Strangbruchs die Chromatinstruktur durch PARP-Aktivität aufgelockert wird, so dass Reparaturenzyme an der Schadensstelle aktiv werden können (*Naegli & Althaus, 1991; Althaus, 1992; Realini & Althaus, 1992; Althaus et al., 1994 und 1999*). Das ADP-Ribose-Polymer konkurriert dabei mit der DNA um dieselben Bindungsstellen an Histonen (*Panzeter, 1993*) und löst diese von der DNA ab. Die Histone relokalisieren wieder, wenn das Polymer durch PARG degradiert wird (Abb. 3).

### **1.3.2 DNA-Reparatur**

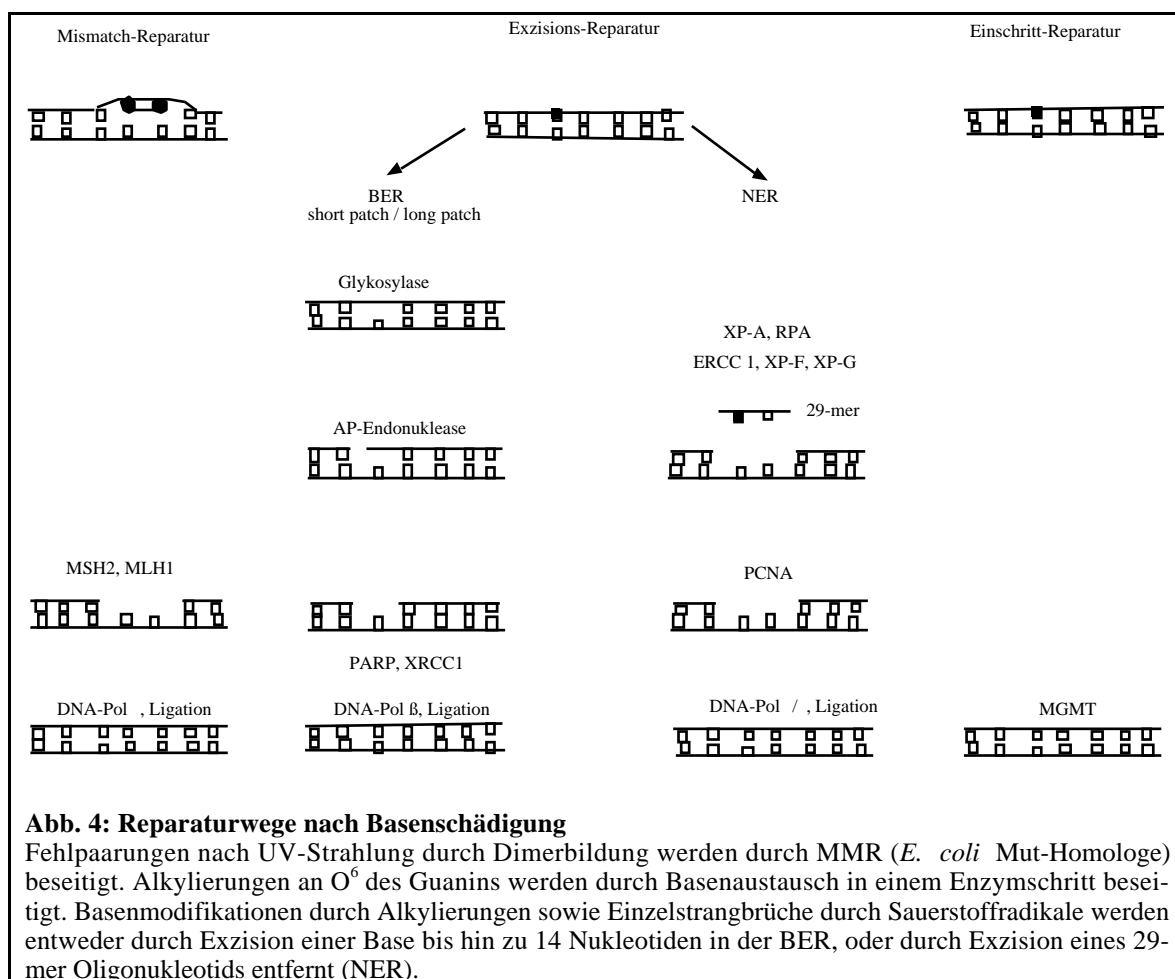
Die Verbindung der PARP zur DNA-Reparatur wurde schon früh postuliert (*Durkacz et al., 1980*). Viele Experimente weisen darauf hin, dass die Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)-ierung entweder auf pharmakologischem Wege (3-Aminobenzamid als kompetitiver Inhibitor) (*Berger et al., 1987*) oder durch Konkurrenz um DNA-Strangbrüche mit einer überexprimierten DNA-Bindungsdomäne der PARP (*Küpper et al., 1990; Molinete et al., 1993*) die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber genotoxischem Stress erhöht (*Küpper et al., 1995*).

Die DNA-Reparatur lässt sich grob vereinfacht in vier Systeme gliedern:

Basen- und Nukleotid-Exzisions-Reparatur, Fehlpaarungs-Reparatur (MMR) und Einschnitt-Reparatur (Übersicht bei *Rajewsky et al., 1998*) (Abb. 4). Die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur inklusive der Rekombination als viertes System komplettiert die Reparaturkapazität der Säugerzelle.

PARP scheint überwiegend in die Basen-Exzisions-Reparatur involviert zu sein. Bei DNA-Schäden, die durch alkylierende Substanzen wie z. B. N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) oder N-Methyl-nitrosoharnstoff (MNU), durch reaktive Sau-

erstoffspezies ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , OH-Radikale, Stickoxide etc.) oder indirekt durch  $\gamma$ -Strahlung bzw. UV-B hervorgerufen werden, wird die betroffene Base durch DNA-N-Glykosylasen ausgeschnitten. Danach agiert eine AP-Endonuklease, die mittels aufeinanderfolgender Aktivität von endonukleolytischer Spaltung des Zucker-Phosphat-Gerüsts und 5'-Phosphodiesterase einen Einzelstrangbruch mit fehlendem Nukleotid generiert. DNA-Polymerase  $\beta$  füllt die Lücke auf, die durch DNA-Ligase III kovalent geschlossen wird (Übersicht bei *Seeberg et al., 1995*). PARP greift zu dem Zeitpunkt ein, an dem der Einzelstrangbruch entstanden ist und steht im Wettstreit mit DNA-Exonukleasen und  $\gamma$ -Polymerasen um die Bindung an die Lücke in der DNA und verdrängt die genannten Enzyme temporär von der Schadstelle (*Sato & Lindal, 1992*). Nach Automodifikation und Auflockerung der Chromatinstruktur gibt sie den Strangbruch wieder frei, so dass nun Reparaturkomplexe kontrolliert Zugang zur Läsion erhalten (*Althaus et al., 1999*).



PARP scheint nicht nur bei der Bindung von DNA-Einzelstrangbrüchen und dem Austausch einzelner Nukleotide eine Rolle zu spielen. Denn sowohl die Hemmung des Enzyms durch 3-Aminobenzamid (*Schwartz & Weichselbaum, 1986; Bürkle et al., 1987; Waldmann & Waldmann, 1991*) als auch die Überexpression der PARP-DNA-Bindungsdomäne (*Küpper et al., 1996*) in immortalisierten Zellen führt nach karzinogenem Stimulus zu einer erhöhten Rate an Schwesterchromatid-Austausch (SCE-Rate) und Genamplifikation. Zelllinien aus PARP defizienten Mäusen zeigen ebenfalls mit oder ohne karzinogenem Stimulus eine erhöhte SCE-Rate (*Menissier-de Murcia et al., 1997; Wang et al., 1997*). Und im Gegensatz dazu führt eine Überexpression der „Volllängen“-PARP in Hamsterzellen zu einer Verringerung der SCE-Rate nach karzinogenem Stimulus (*Meyer et al., 1999*).

Die PARP spielt auch eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Telomerlängen, denn PARP defiziente Mäuse zeigen gewebeunabhängig eine Telomer-Regression vergleichbar mit Telomerase defizienten Mäusen (*di Fagagna et al., 1999*). Die damit verbundene genomische Instabilität zeigt sich durch vermehrte Chromosomenaberrationen (*Simbulan-Rosenthal et al., 1999a*). Dies alles deutet auf eine Funktion der PARP als „Wächter der genomischen Integrität“ hin (*Jeggo, 1998*).

### **1.3.3 Transkription und Replikation**

Der inhibierende Einfluß des Polymers (und damit der PARP) auf die Transkription durch Modifikation von Transkriptionsfaktoren wurde in mehreren Publikationen anhand von *in vitro*-Systemen beschrieben (*Rawling & Alvarez-Gonzalez, 1997; Oei et al., 1997a; 1997b*). Andererseits wird neuerdings auch eine transaktivierende Funktion der PARP *in vivo* diskutiert (*Kannan et al., 1999; Miyamoto et al., 1999; Simbulan-Rosenthal et al., 1999b*). Demnach ist beispielsweise die Transkription von Zielgenen des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wie z. B. induzierbare NO-Synthase (iNOS) und TNF-abhängig von PARP. PARP defiziente Mäuse zeigen nach Induktion durch Lipopoly-

sacharide (LPS) keine NF- $\kappa$ B-Antwort in Makrophagen und sind dadurch resistent gegen septischen Schock (*Oliver et al., 1999*).

Weiterhin interagiert PARP mit den Proteinen des Replisoms (*Simbulan-Rosenthal et al., 1996 und 1998a; Coll et al., 1997; Dantzer et al., 1998*), dem Enzymkomplex, der die Replikation der Erbinformation der Zelle katalysiert. Die Bedeutung ist noch unklar, aber Analogieschlüsse zur Funktion vieler anderer DNA-organisierender Proteine sind durchaus berechtigt.

### **1.3.4 Apoptose**

Während der Apoptose werden abbauende Enzyme wie Endonukleasen (*Liu et al., 1997*) und ICE-("Interleukin-1 converting enzyme") ähnliche Proteasen (Übersicht bei *Thornberry & Lazebnik, 1998*) aktiviert, die sich und andere autokatalytisch bzw. gegenseitig in einer regulierten Kaskade proteolytisch aktivieren. Am Ende steht der organisierte Abbau von Zellstrukturen, der den programmierten Zelltod (PCD) kennzeichnet. Eine dieser Schlüssel-Proteasen ist die Caspase-3, welche die PARP an der spezifischen Erkennungssequenz DEVD in der NLS zwischen den beiden Zinkfingern in zwei definierte Fragmente spaltet (*Wilckens & Delfs, 1986; Lazebnik et al., 1994*). Die Fragmentierung in einen 24 kDa Aminotermminus und in einen 89 kDa Carboxyterminus taucht schon relativ früh in der Apoptose auf und wird als spezifischer Marker für diesen Prozeß angesehen (*Kaufmann et al., 1993; Lazebnik et al., 1994*).

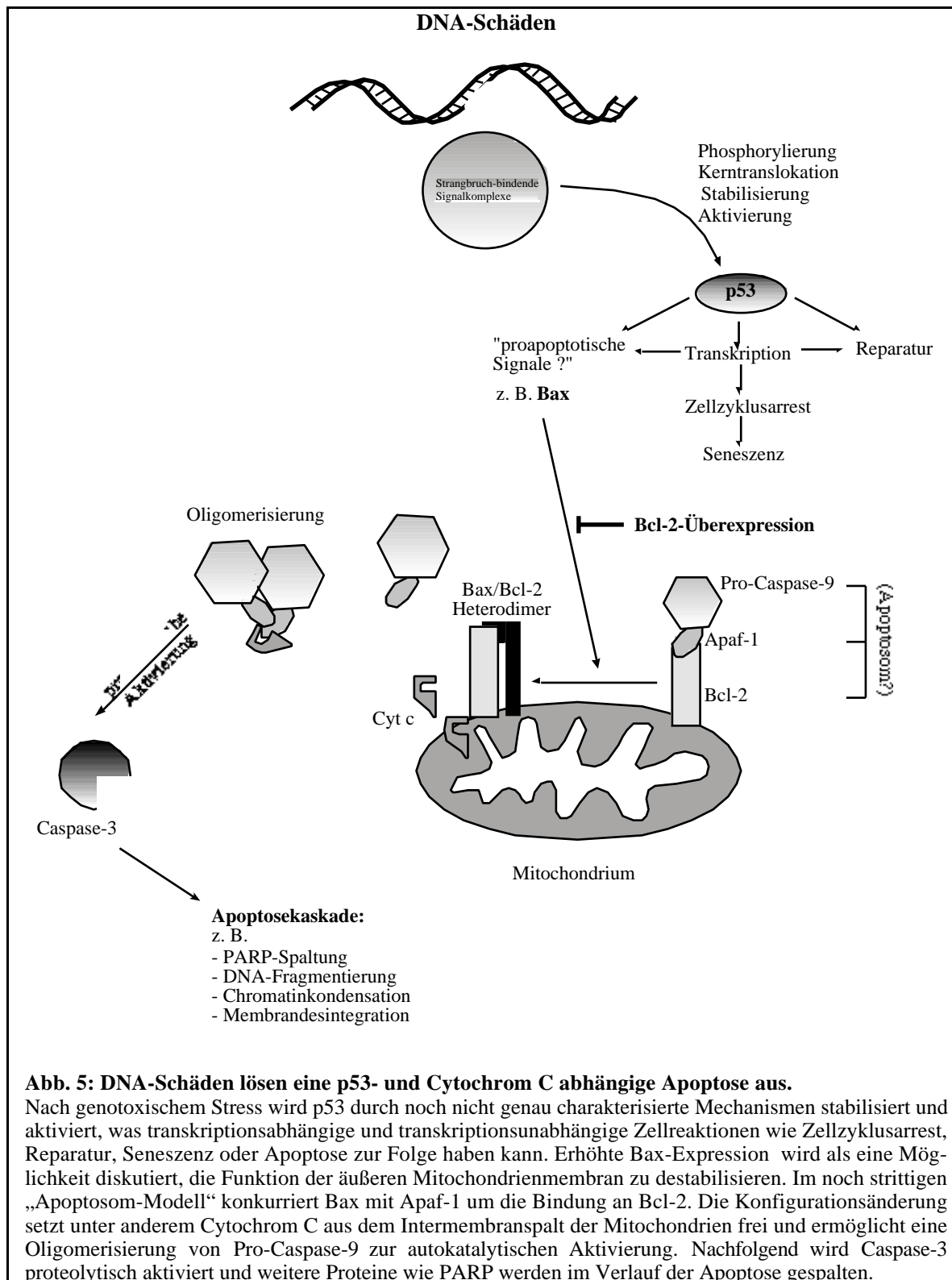
Auslöser einer apoptotischen Kaskade können je nach Zelltyp und Umgebung verschiedene Stimuli wie z. B. Kontaktinhibition, Mangel an Wachstumsfaktoren, Oligomerisierung spezifischer Todesrezeptoren durch deren Liganden, Zellzyklusderegulation oder genotoxischer Stress sein (Übersicht bei *Ashkenazi & Dixit, 1998; Evan & Littlewood, 1998; Hansen & Oren, 1997; Hunter, 1997; Jacobson et al., 1997*). In allen Fällen geht man davon aus, dass die betreffende Zelle Signale von außen mit ihrem eigenen Status integriert und über evolutionär konservierte Signalkaskaden schließlich das Schicksal der



Zelle bestimmt wird. Ein zentraler Knotenpunkt für die Entscheidung über Leben und Tod einer Zelle ist z. B. das Multifunktionsprotein p53 bei der Kontrolle und Regulation der genomischen Integrität (Übersicht bei *White, 1996; Hansen & Oren, 1997; Evan & Littlewood, 1998*).

Ebenso bedeutsam ist die Familie antagonistischer, heterodimerisierender Bcl-2-Proteine bei der Kontrolle und Regulation der Ionenkonzentrationsgefälle in der Zelle einerseits und der Caspasekaskade andererseits (Übersicht bei *White, 1996; Rao & White, 1997; Adams & Cory, 1998*). Die Signalkaskaden sind im Einzelnen noch ungeklärt, aber neuere Befunde deuten darauf hin, dass die Mitochondrien in vielen Fällen der Apoptose eine entscheidende Rolle spielen (Übersicht bei *Green & Reed, 1998*).

Unter genotoxischem Stress beispielsweise wird nicht nur PARP aktiviert, sondern je nach Zelltyp auch p53 als Protein in der Folge stabilisiert und aktiviert (*Fritsch et al., 1993; Whitacre, 1995; Agarwal et al., 1997; de Murcia et al., 1997; Vaziri et al., 1997*). Ebenso wird in manchen Zelltypen Bax als transkriptionelles Zielgen von p53 nach DNA-Schäden hochreguliert (*Miyashita et al., 1995; Han et al., 1996; Ho et al., 1999; Zhan et al., 1994*). Bax ist in der Lage wie Bcl-2 als sein Antagonist den Ionenaustausch über die äußere Mitochondrienmembran zu beeinflussen. Dabei wird die Freisetzung von Cytochrom C (Cyt c) und anderen Apoptoseaktivatoren aus dem Intermembranspalt durch Bax gefördert (*Haupt et al., 1995; Han et al., 1996; Hansen & Oren, 1997; Yin et al., 1997*) bzw. durch Bcl-2 inhibiert (*Vaux et al., 1988; Hockenberry et al., 1990*). Im weiteren Verlauf bewirkt Cytochrom C im Cytoplasma durch Bindung an Caspaseadap-toren wie Apaf-1 die Oligomerisierung von Pro-Caspase-9 zu aktivierten Komplexen und damit die autokatalytische Aktivierung der Caspase-9. Pro-Caspase-3 als Substrat von aktivierter Caspase-9 wird durch proteolytische Spaltung in den aktiven Zustand über-führt und spaltet seinerseits viele für die Apoptose relevante Proteine - unter anderem auch PARP (Übersicht bei *Green & Reed, 1998; Adams & Cory, 1998; Yang et al., 1998*) (Abb. 5).



**Abb. 5: DNA-Schäden lösen eine p53- und Cytochrom C abhängige Apoptose aus.**

Nach genotoxischem Stress wird p53 durch noch nicht genau charakterisierte Mechanismen stabilisiert und aktiviert, was transkriptionsabhängige und transkriptionsunabhängige Zellreaktionen wie Zellzyklusarrest, Reparatur, Seneszenz oder Apoptose zur Folge haben kann. Erhöhte Bax-Expression wird als eine Möglichkeit diskutiert, die Funktion der äußeren Mitochondrienmembran zu destabilisieren. Im noch strittigen „Apoptosom-Modell“ konkurriert Bax mit Apaf-1 um die Bindung an Bcl-2. Die Konfigurationsänderung setzt unter anderem Cytochrom C aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien frei und ermöglicht eine Oligomerisierung von Pro-Caspase-9 zur autokatalytischen Aktivierung. Nachfolgend wird Caspase-3 proteolytisch aktiviert und weitere Proteine wie PARP werden im Verlauf der Apoptose gespalten.

Trotz der Spaltung von PARP während der Apoptose, kommt es zur zellulären Produktion großer Mengen an Poly(ADP-Ribose) (Bernardi *et al.*, 1995; Negri *et al.*, 1997). Ob PARP und/oder die Spaltung von PARP eine direkte Rolle bei der Apoptose spielen, ist

nach den Untersuchungen an PARP defizienten Mäusen umstritten (*de Murcia et al., 1997; Wang et al., 1997; Oliver et al., 1998; Le Rhun et al., 1998; Simbulan-Rosenthal et al., 1998b; Simbulan-Rosenthal et al., 1999c*). Spezifische Inhibitoren der Caspasen verhindern zwar die Spaltung der PARP, aber auch vieler anderer Zielproteine wie z. B. nukleäres Lamin und blockieren somit den Ablauf der Apoptose (Übersicht bei *Thornberry & Lazebnik, 1998*).

Dies kann prinzipiell dazu führen, dass in der Zelle der  $\text{NAD}^+$ - und ATP-Spiegel sinkt (*Alvarez-Gonzalez et al., 1986*) und einen Prozess initiiert, der als Nekrose bezeichnet wird. Sowohl bei der Regulation der ATP/ADP-Konzentration - und damit auch des  $\text{NAD}^+$ -Spiegels - als auch bei der Aktivierung der Caspasekaskade spielen die Mitochondrien und vor allen Dingen Proteine der Bcl-2-Familie eine entscheidende Rolle (*Shimizu et al., 1999*).

### **1.3.5 Nekrose**

Nach Induktion von massiven DNA-Schäden oder Inhibierung der Reparatur *in vitro* kommt es durch die dauerhafte Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase zu einem ständigen Verbrauch des zellulären  $\text{NAD}^+$ -Vorrats und nachfolgend zu einer Verringerung des ATP-Bestands aufgrund der anlaufenden  $\text{NAD}^+$ -Neusynthese und/oder der Hemmung der Glykolyse und Atmung. Der schlagartige Umsatz des Energievorrats an ATP zieht schließlich den nekrotischen Zelltod nach sich (*Berger, 1985; Watson et al., 1995*).

Nach LPS-Injektion (Lipopolysaccharide der äußeren Bakterienzellmembran) durchlaufen Mäuse Symptome des septischen Schocks, einhergehend mit TNF (Tumor Nekrose Faktor) induzierter massiver Nekrose und systemischer Entzündungsreaktion. PARP defiziente Mäuse zeigen weder Nekrose noch Schocksymptome (*Oliver et al., 1999*). Nach Sauerstoffunterversorgung bzw. Behandlung mit NO zeigen neuronale Zellen aus PARP defizienten Mäusen wie auch pharmakologisch PARP-inhibierte Zellen eine erhöhte Überlebensrate (*Eliasson et al., 1997; Endres et al., 1997*). Analoge Ergebnisse

gelten für pankreatische Inselzellen nach Behandlung mit Sauerstoffradikalen bzw. NO (Heller *et al.*, 1995; Burckhardt *et al.*, 1999). Dies weist auf die Involvierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase bei der Pathogenese des septischen Schocks, des ischämischen Schlaganfalls bzw. des juvenilen (TypI) Diabetes mellitus hin und eröffnet prinzipiell die Aussicht auf eine „Zellrettende Therapie“ durch Gabe von spezifischen PARP-Inhibitoren.

## **1.4 Maus *in vivo*-Modelle**

Für die Aufdeckung physiologischer Zusammenhänge ist man in der Grundlagen- wie auch in der angewandten Forschung auf *in vivo*-Experimente im Tiermodell angewiesen. Transgene wie auch Gen inaktivierte Mäuse sind mittlerweile ein unverzichtbares Werkzeug für die Aufklärung von Zusammenhängen bei genetisch bedingten Krankheiten wie z. B. Krebs.

Durch Mikroinjektion von Fremd-DNA in das Genom von Keimbahnzellen können Gene unter Kontrolle gewebsspezifischer Promotoren und Enhancer exprimiert und an nachfolgende Generationen stabil weitergegeben werden (Gordon *et al.*, 1980; Hogan *et al.*, 1994). In so einem experimentellen *in vivo*-System können beispielsweise die Kooperation von Onkogenen untersucht werden (Cory & Adams, 1988; Hanahan, 1989), und im Allgemeinen zeigen transgene Mäuse, die ein Onkogen exprimieren, eine erhöhte Tumorzinzidenz. Kreuzt man in einen solchen Stamm Tiere ein, die ein kooperierendes Transonkogen exprimieren, beschleunigt sich die Tumorentstehung bei den doppeltransgenen Tieren hinsichtlich der Inzidenz und Latenzzeit (Sinn *et al.*, 1987).

### **1.4.1 Bcl-2 als Onkogen**

Bcl-2 gehört zu einer Genfamilie von zum Teil Membran gebundenen zum Teil zytoplasmatischen Proteinen, die als Heterodimere sowohl pro- als auch antiapoptotische Funktionen haben (Übersicht in Rao & White, 1997; Adams & Cory, 1998).

Klinisch wurde Bcl-2 häufig in humanen follikulären Lymphomen als überexprimiert entdeckt. Durch die Chromosomentranslokation t(14:18) steht das Gen unter der Kontrolle eines Intron-Enhancers für die schwere Kette der Immunglobuline ( $E\mu$ ) (Tsujiimoto, 1984). Durch die Überexpression dieses Antiapoptose-Gens in B-Lymphozyten reichern sich B-Zellen in den Follikeln der Milz an bzw. überleben explantierte B-Zellen länger in Kultur (Vaux *et al.*, 1988; Hockenberry *et al.*, 1990). Durch die Überexpression von Bcl-2 allein wird eine Zelle noch nicht transformiert. Um einen klonalen Tumor entstehen zu lassen, bedarf es weiterer Mutationsschritte. Ein sehr häufig gemeinsam auftretendes Phänomen in follikulären Lymphomen ist die Aktivierung des Onkogens c-Myc durch chromosomale Translokation in den genomischen Locus für die schwere Kette der Immunglobuline. Kreuzungen zwischen Mäusen, die entweder *Myc* oder *Bcl-2* als Transonkogen exprimieren, zeigen, dass die doppeltransgenen Tiere kurz nach der Geburt verschiedene B- oder sogar T-Zelltumoren entwickeln (Strasser *et al.*, 1990; Zörnig *et al.*, 1995).

Die physiologische Expression von Bcl-2 erstreckt sich normalerweise von ubiquitär in der Embryonalentwicklung der Maus, bis hin zu sehr eingeschränkt auf Stammzellen, die sich schnell teilen und differenzieren bzw. Zellen des peripheren Nervensystems in der erwachsenen Maus (Merry *et al.*, 1994).

Die Überexpression des *E $\mu$ -Bcl-2* Transgens in T-Lymphozyten schützt die sonst so empfindlichen  $CD4^+/CD8^+$ -Thymozyten vor der durch Dexamethason (p53 unabhängig) und  $\gamma$ -Strahlung (p53 abhängig) induzierten Apoptose, aber nicht vor der durch Vernetzung des T-Zellrezeptorkomplexes vermittelten Negativselektion im Thymus (Sentman *et al.*, 1991). Bcl-2 ist daher ein Schlüsselprotein, das viele verschiedene Apoptosestimuli aber längst nicht alle blockieren kann (Übersicht in Rao & White, 1997). Lymphozyten aus *E $\mu$ -Bcl-2* transgenen Mäusen, die chemisch oder enzymatisch generierte DNA-Schäden anhäufen, durchlaufen wegen der Bcl-2-Überexpression nicht mehr die Apoptose. Sie können sich weiter teilen und Mutationen anhäufen, die ihnen umgebungsbedingte Wachstumsvorteile verschaffen, bis eine der Zellen entartet. Diese Zelle kann sich wachstumsfaktor- und kontaktunabhängig vermehren und zu einem klonalen Tumor auswach-

sen (Mehrschritt- und klonale Evolutionstheorie). Bcl-2 ist damit ein Onkogen, das das Überleben einer potentiellen Tumorzelle mit DNA-Schäden und einhergehenden Mutationen erst ermöglicht.

#### **1.4.2 p53 als Tumorsuppressorgen**

Schon früh wurde deutlich, dass die Entstehung von Krebs auf genetische Veränderungen zurückzuführen ist. Bei einigen der betroffenen Gene, ist eine Kopie (Allel) durch Chromosomendeletion verloren gegangen. Die Gene kodieren für Proteine, welche die Zellvermehrung hemmen bzw. den Zelltod einleiten. Fehlen solche proliferationshemmenden oder auch proapoptotischen Kontrollelemente, wird ein dereguliertes Wachstum der Zelle möglich (*Marshall, 1991*). Das klassische Beispiele hierfür ist das p53-Gen, das in mehr als 50 % aller humanen Tumoren Deletionen und Punktmutationen aufweist (*Baker et al., 1989; Marshall, 1991*). Das p53-Protein ist unter anderem dafür verantwortlich, dass Zellen mit DNA-Schäden, die zu fehlerhafter DNA-Replikation führen, am G1-S-Phasekontrollpunkt ihres Zellzyklus' arretieren und ein genetisch determiniertes Todesprogramm (PCD) durchlaufen, wenn die Schäden nicht behoben werden können (*Lowe et al., 1993*). Die Feinabstimmung welcher p53 abhängige Weg beschritten wird, hängt von Parametern wie Art und Schwere der DNA-Schäden, Zelltyp und Umgebung ab (Übersicht bei *Hansen & Oren, 1997; Evan & Littlewood, 1998*).

Untersuchungen an Thymozyten von p53 defizienten Mäusen als *in vivo*-Modell haben ergeben, dass DNA-Schädigung durch z. B. Etoposid, MNNG oder  $\gamma$ -Strahlung die Zellen nicht in Apoptose treibt - im Gegensatz zu den viel empfindlicheren Wildtypzellen (*Lowe et al., 1993*). Zudem ist die Cancerogenese durch  $\gamma$ -Bestrahlung viel effektiver in p53 defizienten Mäusen als in Wildtyptieren (*Donehower et al., 1992*). Nicht nur, dass DNA geschädigte Zellen nicht ausgemerzt werden, sondern auch das Fehlen von p53 allein begünstigt schon die Entstehung von Mutationen. In Kultur zeigen primäre embryonale Fibroblasten von p53 defizienten Mäusen sehr rasch nach drei bis vier Mitosen

Chromosomenaberrationen (*Fukasawa et al., 1996*). p53 defiziente Mäuse entwickeln innerhalb weniger Monate typischerweise Thymome, wahrscheinlich durch fehlerhafte V(D)J-Rekombination der T-Zellrezeptorgene und das anschließende Überleben dieser Zellen (*Donehower et al., 1992; Guidos et al., 1996*).

Daraus ergibt sich folgendes Problem: Der Ausfall von p53 durch Mutation hat zur Folge, dass die Entstehung weiterer Mutationen begünstigt wird. Gleichzeitig ist die Zelle ohne funktionelles p53 unempfindlich gegen eine Reihe von Apoptosestimuli wie DNA-Schädigung, Sauerstoffunterversorgung und Wachstumsfaktorentzug. Therapeutische Ansätze und physiologische Bedingungen können diesen Tumoren deshalb häufig nichts anhaben. Eine erfolgversprechende Therapie müsste entweder auf eine Wiederherstellung der p53-Funktion abzielen, oder p53 unabhängige Apoptosewege aufgreifen.

#### **1.4.3 Poly(ADP-Ribose) in PARP defizienten Mäusen**

Durch den Nachweis geringer ADP-Ribose-Polymermengen nach genotoxischem Stress in Zellen aus PARP defizienten Mäusen (*Shieh et al., 1998*) und der Klonierung weiterer Mitglieder aus der PARP-Familie in Säugerzellen (*Smith et al., 1998 ; Amé et al., 1999*) bestehen Unsicherheiten, ob die Ergebnisse durch Redundanzeffekte überlagert werden. Ein Hinweis für diese Hypothese sind sehr unterschiedliche Effekte aus Untersuchungen an zwei verschiedenen PARP defizienten Mausstämmen (*Wang et al., 1995; de Murcia et al., 1997; Übersicht bei Jeggo, 1998*). Einerseits zeigen immortalisierte Fibroblasten nach Methyl-Methansulfonat (MMS)-Behandlung deutliche Defekte in der Basen-Exzisions-Reparatur mit anschließendem G2/M-Arrest und vermehrter Apoptose (*Ménissier de-Murcia et al., 1997; Trucco et al., 1998*). Andererseits verhalten sich Fibroblasten aus den von *Wang et al.* generierten PARP defizienten Mäusen bezüglich der Fas-induzierten Apoptose resistent (*Simbulan-Rosenthal et al., 1998b*) und werden nur durch eine Caspase-3-resistente Form der PARP sensitiviert (Nekrose?). Im Gegensatz dazu sind die Fibroblasten aus den PARP defizienten Mäusen von *de Murcia et al.* sehr

sensitiv gegenüber Fas-induzierter Apoptose und sterben durch eine Caspase-3-resistente PARP-Mutante nur verzögert (*Oliver et al., 1998*).

Kreuzungen mit ATM- oder DNA-PK defizienten Mausstämmen weisen deutliche Effekte bezüglich der Rekombination und Entwicklung bei Thymozyten auf. Der SCID-Phänotyp, der einen Arrest im CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>-Thymozytenstadium und nur etwa 1 % der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Thymozyten aufweist, wird durch den Wegfall von PARP zum Teil aufgehoben. Grundlage ist die „illegitime Rekombination“ im T-Zellrezeptorlokus und damit erhöhte genomische Instabilität, die schließlich zu einer erhöhten Rate an T-Zelllymphomen führt (*Morrison et al., 1997*).

Der gleichzeitige Ausfall von ATM und PARP hingegen ist bereits embryonal letal (*Dantzer et al., 1999*).

## **1.5 Zielsetzung**

Die Verbindung von induzierten oder spontanen DNA-Schäden über ihre Erkennung und Reparatur bis hin zur Exekution der Apoptose wird durch ein komplexes Netzwerk an Signalen reguliert. Die Frage nach den Aufgaben der PARP in diesem für den ganzen Organismus entscheidenden Ablauf ist berechtigt, wenn man die doch sehr gegensätzlichen physiologischen Konsequenzen der PARP-Inhibition vom Überleben bis hin zur beschleunigten Apoptose in verschiedenen Modellsystemen betrachtet. Die Restriktion auf das genotoxisch empfindliche T-Zellkompartiment im genetisch erprobten Mausmodell ermöglicht eine determinierte und gut zugängliche gewebespezifische Untersuchung der Effekte in Bezug auf Proliferation, Differenzierung und Funktion der T-Zellen *in vivo*, ohne die Risiken durch biochemische Artefakte oder genetisch nicht definierte Parameter der *in vitro*-Systeme.

Der Einfluß der endogenen PARP durch die Poly(ADP-Ribosyl)-ierung auf die DNA-Reparatur einerseits und die Apoptose andererseits sollte *in vivo* gezeigt und Redundan-



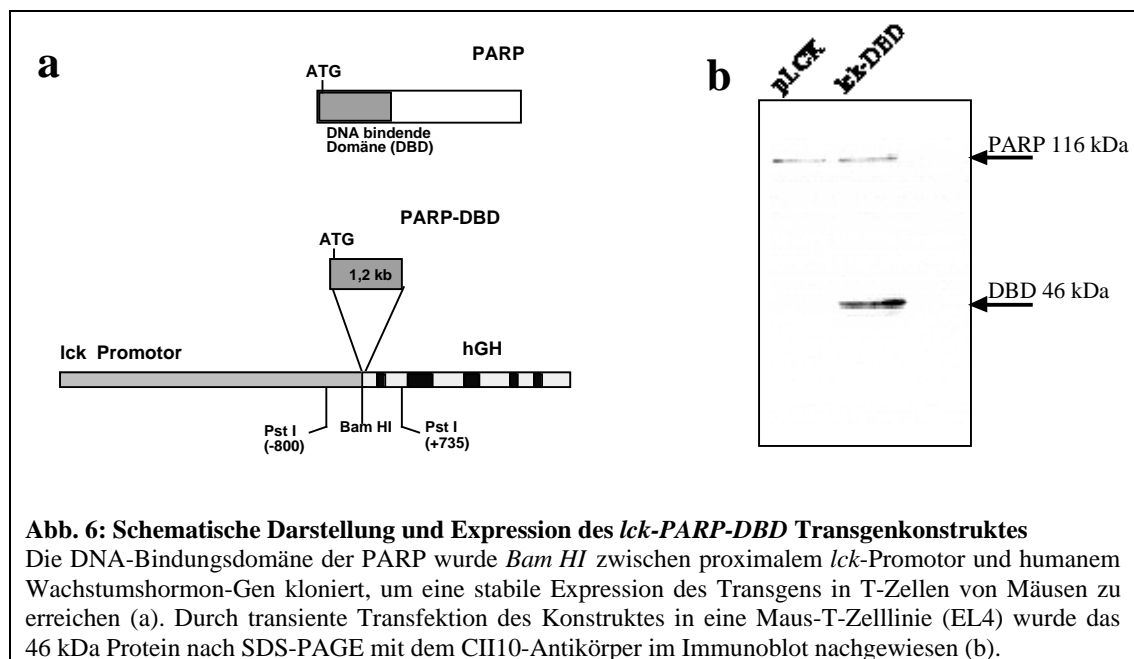
zeffekte ausgeschlossen werden. Voraussetzung dafür ist der Nachweis für die funktionelle Wirksamkeit einer kompetitiv wirkenden, aber enzymatisch inaktiven Mutante neben der endogenen PARP *in vivo*. Durch Kreuzung mit *Eμ-Bcl-2* transgenen bzw. *p53*<sup>-/-</sup>-Mäusen sollten die jeweiligen Auswirkungen der dominant negativen PARP-Mutante auf die DNA-Reparatur und die Apoptose in Abhängigkeit von p53 und Bcl-2 überprüft werden. Desweiteren bestand die Aufgabe, diese mehrfachtransgenen Tiere daraufhin zu beobachten, ob sie spontan schneller Tumoren als die p53 defizienten bzw. einzeltransgenen Mäuse entwickeln (*Marin et al., 1994*).

## 2 ERGEBNISSE

### 2.1 Expression des *lck-PARP-DBD* Transgenkonstruktes

Um die *in vivo*-Funktion der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) näher zu analysieren und dabei die geschilderte Problematik der beiden PARP defizienten Mausstämme zu umgehen, sollten transgene Mäuse hergestellt werden, die eine dominant negative PARP-Mutante neben der endogenen PARP exprimieren. Die DNA-Bindungsdomäne der PARP (DBD) sollte in den T-Zellen des Thymus und der peripheren lymphatischen Organe exprimiert werden. Durch Verwendung des proximalen Promotors des Gens für die Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> wurde eine T-Zell spezifische Expression erreicht.

#### 2.1.1 Das *lck-PARP-DBD* Transgenkonstrukt



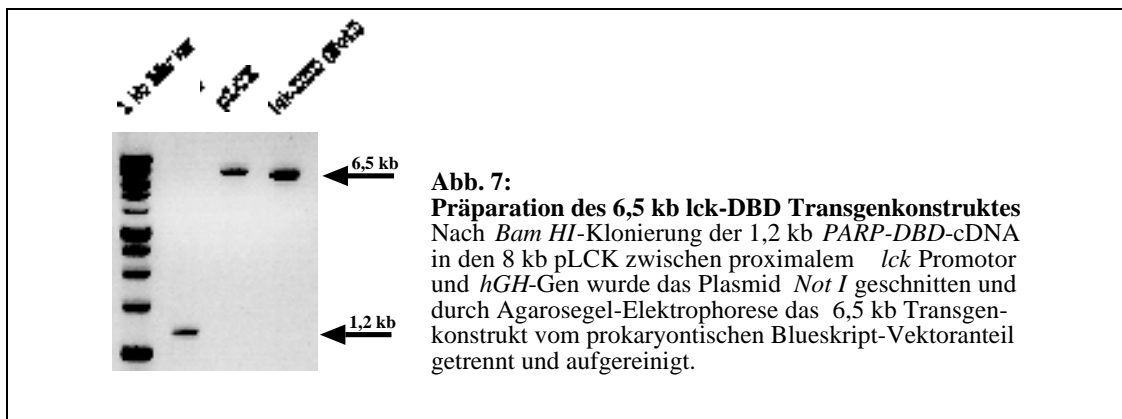
Die 1,2 kb cDNA der DBD (Küpper *et al.*, 1990) wurde *Bam HI* in den pLCK zwischen proximalem *lck*-Promotor und dem *hGH*-Gen kloniert (Abb. 6a). Die Übergänge wurden anschließend sequenziert. Während der 3,2 kb *lck*-Promotor die gewebespezifische Expression des Transgens reguliert, ist der 2,0 kb *hGH*-Anteil des Vektors mit seiner genomischen Sequenz des „human growth hormone“ und eines Polyadenylierungssignals

für das Spleißen und die Termination der Vorläufer-RNA des Transgentranskriptes verantwortlich.

Die Funktionalität dieses Konstruktes wurde durch transiente Transfektion in die EL4 Thymomzelllinie (Maus) mit anschließendem Immunoblot der Proteinextrakte überprüft (Abb. 6b).

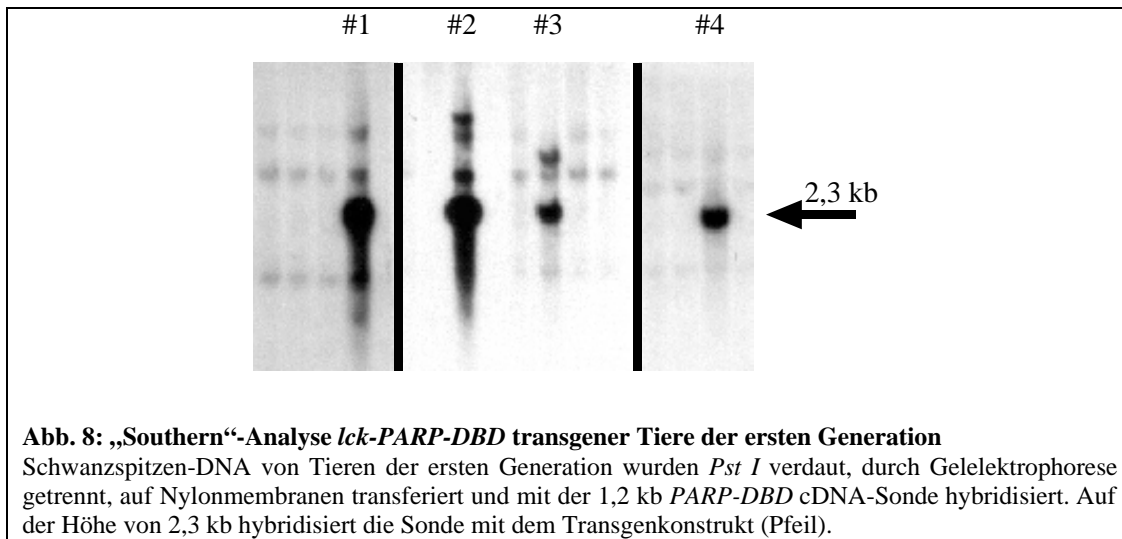
### 2.1.2 Etablierung *lck-PARP-DBD* transgener Mauslinien

Das 6,5 kb *lck-PARP-DBD* Transgenkonstrukt wurde nach Entfernung des prokaryontischen Vektoranteils mittels *Not I* Restriktionsendonuklease aufgereinigt und in fertilierte Oozyten der Maus injiziert (Abb. 7).



Die manipulierten Mausoozyten wurden pseudoschwangeren Leihmüttern reimplantiert (in der Arbeitsgruppe durchgeführt von B. Zevnik). Die genomische Integration des Transgens wurde durch „Southern“-Analyse der Schwanzspitzen-DNA von den Nachkommen festgestellt. Im Falle des *lck-PARP-DBD* Transgens wurde die genomische DNA *Pst I* verdaut und nach Gelelektrophorese und Transfer auf eine Nylonmembran mit der 1,2 kb cDNA, die der Sequenz der DBD entspricht, hybridisiert. Die zusätzlichen schwachen Signale neben dem deutlichen Signal in Höhe von 2,3 kb entsprechen dem Restriktionsmuster des endogenen PARP-Lokus. Durch die bei 2,3 kb erscheinenden Signale konnte die erste Generation transgener Tiere („Founder“) identifiziert werden (Abb. 8). Diese wurden mit nicht-transgenen C57/Bl6 Mäusen gekreuzt, um eine transgene Linie zu etablieren. Die Mehrzahl der transgenen Tiere der ersten Generation

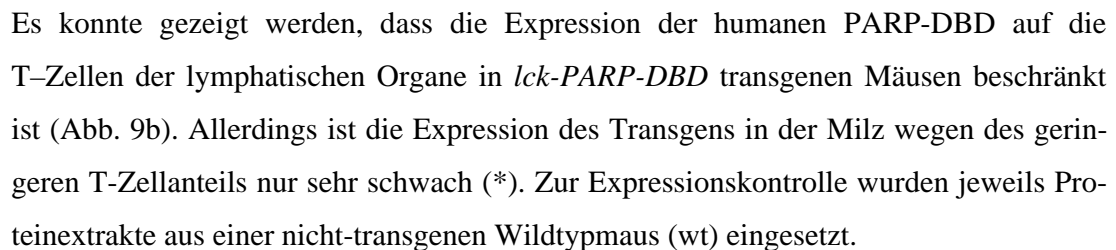
enthalten eine Vielzahl von Kopien des Transgenkonstruktes hintereinander in ihrem Genom, was sich aus der Stärke des Signals ableiten läßt.



### 2.1.3 Expression der PARP-DBD in T-Zellen *lck-PARP-DBD* transgener Mäuse

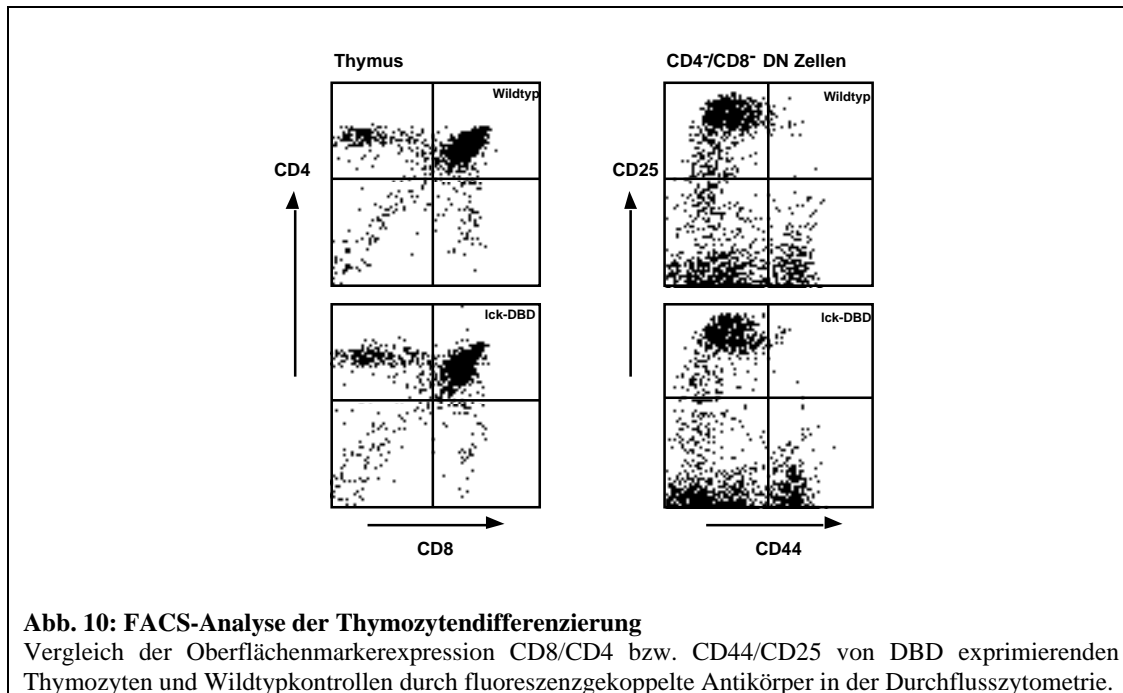
Die Kopienzahl des Transgens im Genom sagt noch nichts über die tatsächliche Expressionsstärke aus. Die Nähe zu „Silencer“-Elementen oder der Methylierungsgrad des genomischen Locus können einen inhibierenden Einfluß auf die Expression des dort integrierten Transgenkonstruktes haben.

Die Expression des *lck-PARP-DBD* Transgens wurde in verschiedenen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen durch Immunoblot („Western“) untersucht. Der Nachweis der humanen PARP-DBD in den Proteinextrakten aus Einzelzellsuspensionen des Thymus und der peripheren lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten der transgenen Mauslinien wurde mit dem monoklonalen Zinkfinger-II spezifischen Antikörper CII10 erstellt (*J.-H. Küpper*). Ebenso wurde die Relation der Expressionsstärke zwischen der DBD und der endogenen PARP mit diesem Antikörper ermittelt. Der Antikörper erkennt sowohl die humane wie auch die murine PARP. Durch ein entsprechendes Computerprogramm wurden die mit einer digitalen Kamera aufgenommenen ECL-Signale ausgewertet.

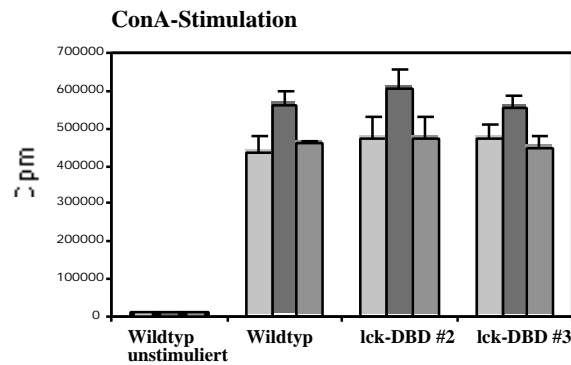


Eine Analyse der Einzelzellsuspensionen verschiedener lymphatischer Organe 4-8 Wochen alter transgener Mäuse ergab keine Abweichungen im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren. Dies betraf sowohl die Zellzahl als auch die Verteilung der verschie-

denen Subpopulationen in Thymus, Milz und Lymphknoten bei der FACS-Analyse (Abb. 10). Hier konnten alle Schritte der Thymozytendifferenzierung gezeigt werden, von den  $CD4^-/8^-$  doppeltnegativen (DN) über die  $CD4^+/8^+$  doppeltpositiven (DP) bis hin zu den einzelpositiven (SP) Zellen, die den Thymus verlassen und in die peripheren lymphatischen Organe auswandern.



Da die PARP eine Rolle bei der Proliferation und DNA-Synthese spielen kann, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die Expression des PARP-DBD Transgens die Progression von T-Zellen aus der G0/G1- in die S-Phase beeinflusst. Hierzu wurden periphere T-Zellen aus Lymphknoten *in vitro* mit dem Lektin Concanavalin A stimuliert (unter anderem Vernetzung des T-Zellrezeptorkomplexes) und ihr Eintritt in die S-Phase durch Aufnahme radioaktiv markierten Thymidins gemessen. Ein Vergleich von T-Zellen aus *lck-PARP-DBD* transgenen Mäusen mit solchen aus Wildtypkontrollen zeigte, dass die DBD exprimierenden T-Zellen *in vitro* genauso stimulierbar waren wie Kontrollzellen (Abb. 11).



**Abb. 11: *In vitro*  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau in ConA stimulierten peripheren T-Zellen**

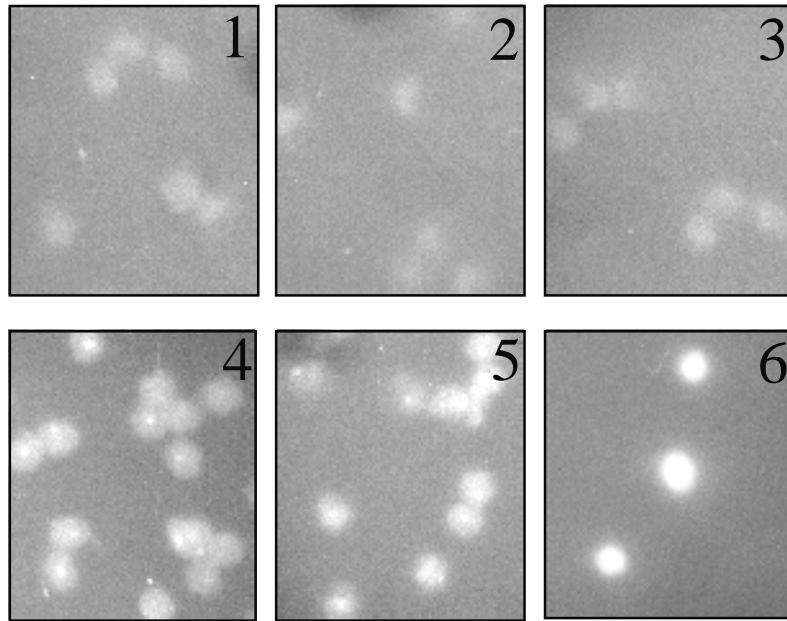
Die *in vitro*-Stimulation des T-Zellrezeptorkomplexes mit dem Lektin ConA aktiviert die T-Zellproliferation. Dargestellt sind 3 unabhängige Experimente am dritten Tag nach ConA-Stimulation mit Mittelwert und Standardabweichung aus je 5 Messwerten.

### 2.1.5 Überexpression der PARP-DBD inhibiert ADP-Ribose-Polymerbildung

Um die Funktionalität der PARP-DBD nachzuweisen, wurde die Bildung der Poly(ADP-Ribose) - das Produkt der endogenen PARP nach genotoxischem Stress - durch *in situ*-Immunfluoreszenz analysiert. Thymozyten aus *lck-PARP-DBD* transgenen und nicht-transgenen Mäusen wurden mit dem DNA-methylierenden Agens N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) behandelt und nach TCA/Ethanol-Fixierung mit dem für das ADP-Ribose-Polymer spezifischen Antikörper 10H inkubiert. Nach Inkubation mit einem entsprechenden Zweitantikörper konnten die Polymersignale im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

Dabei stellte sich heraus, dass in den Thymozyten der Linien *lck-PARP-DBD* #1 und #2 keine Poly(ADP-Ribose) nach MNNG-Behandlung detektierbar war, im Gegensatz zu den Restpolymersignalen in den Thymozyten der transgenen Linien #3 und #4. Jedoch war ein deutlicher gradueller Unterschied zu den hellen Signalaggregaten der nicht-transgenen Kontrolle erkennbar (Abb. 12).

Das Ziel, die Polymerasefunktion der PARP zu inhibieren, indem die DBD mit ihr um die Bindung an DNA-Strangbrüche konkurriert, wurde also mit den Linien *lck-PARP-DBD* #1 und #2, nicht aber mit den Linien #3 und #4 erreicht.



**Abb. 12: Immunfluoreszenz der Poly(ADP-Ribose) in Thymozyten nach Behandlung mit MNNG**  
 Unbehandelte Thymozyten aus Wildtypmäusen zeigten mit dem Antikörper 10H und dem Cy2-gekoppelten Zweitantikörper kein Polymer in der Fluoreszenzmikroskopie (1). Nach 20 min 40  $\mu$ M MNNG Behandlung waren graduelle Unterschiede in der Polymerbildung zwischen den transgenen *lck-PARP-DBD* Linien #1 (2), #2 (3), #3 (4) und #4 (5) einerseits und der Wildtypkontrolle (6) andererseits erkennbar. Die Belichtungszeit wurde für alle Aufnahmen konstant bei 1 min gehalten (800 Asa Film, Kodak).

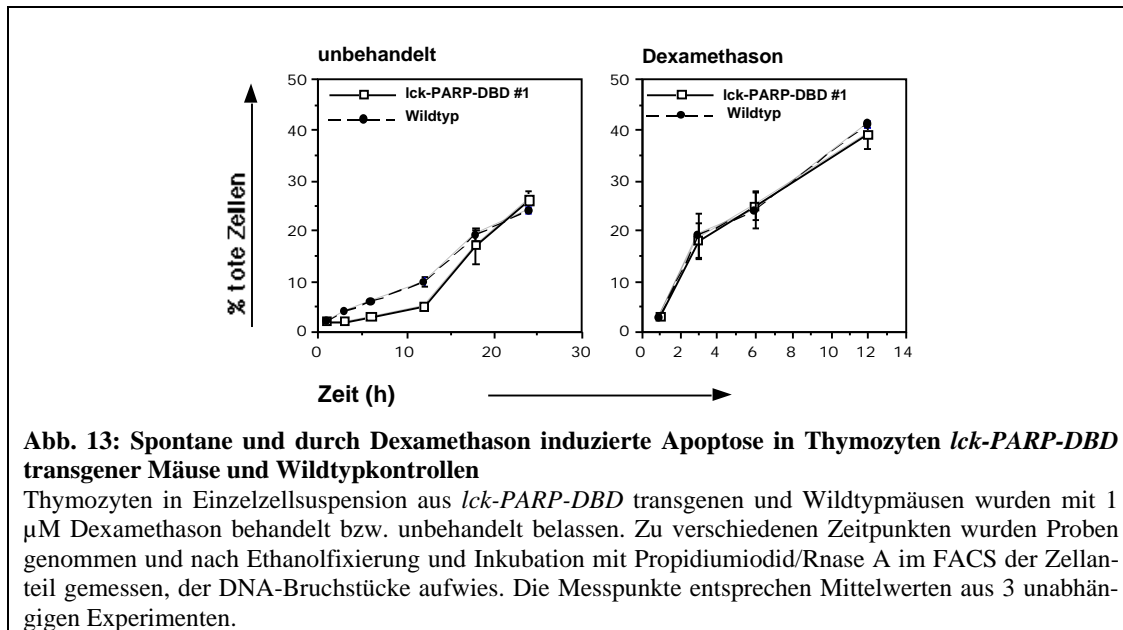
### 2.1.6 Spontane und durch Dexamethason induzierte Apoptose in Thymozyten

Im Verlauf der T-Zellentwicklung im Thymus werden nicht nur ständig neue Thymozyten gebildet (bis zu  $5 \times 10^7$  pro Tag), sondern sterben genauso viele durch programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt. 97 % der täglich im Thymus neugebildeten Zellen durchlaufen diesen Weg des Untergangs, um eine Thymushomöostase aufrechtzuerhalten und eine geordnete, störungsfreie Immunantwort zu ermöglichen. Apoptose kann in Thymozyten durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden, unter anderem durch Wachstumsfaktorentzug oder aber auch - im Gegensatz zu primären Fibroblasten - durch das synthetische Steroidhormon Dexamethason.

Da PARP eine Funktion bei der Apoptose haben kann, wurden zur Klärung der Frage, ob PARP bzw. PARP-DBD mit diesem Aspekt der Thymusentwicklung interferiert, Thymozyten explantiert und in Kultur genommen. Die kultivierten Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit 1  $\mu$ M Dexamethason behandelt. Für die zeitabhängige Apop-



tosestudie wurde im FACS der Prozentsatz an Zellen bestimmt, bei dem nach Ethanolfixierung und Propidiumiodidfärbung DNA-Bruchstücke nachweisbar waren. Die *lck-PARP-DBD* transgenen Zellen zeigten in einem Zeitraum von 24 Stunden gegenüber den Kontrollzellen weder eine Beschleunigung noch eine Inhibierung der spontanen sowie der durch Dexamethason induzierten Apoptose (Abb. 13).

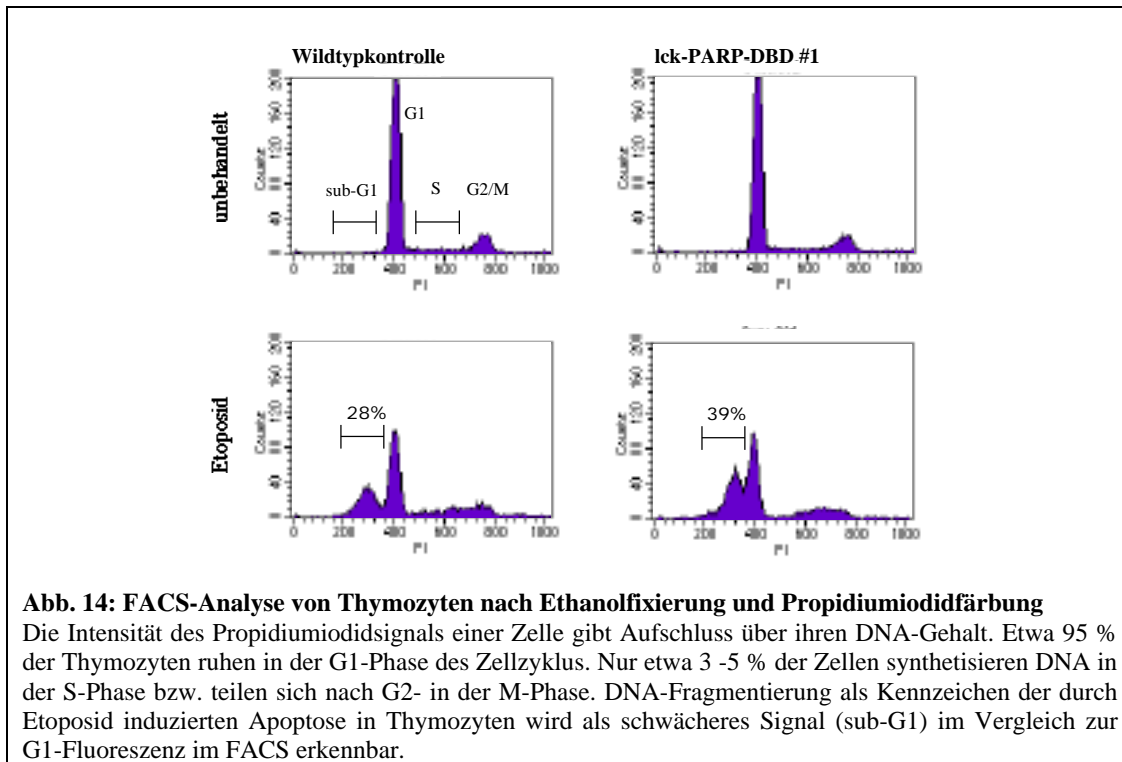


Das heißt, dass weder die Überexpression der DBD noch die dadurch bedingte Inhibierung der ADP-Ribose-Polymerbildung einen Einfluss auf diese Formen der Apoptose zu haben scheinen.

## 2.2 PARP-DBD beschleunigt Apoptose nach genotoxischem Stress

Thymozyten reagieren sehr empfindlich auf DNA-Schäden und durchlaufen dabei einen Prozess, der Apoptose genannt wird. DNA-Schäden können z. B. durch UV- oder ionisierende Strahlung, reaktive Sauerstoffradikale, oder verschiedene Chemotherapeutika hervorgerufen werden. Im Prinzip wirken die Chemotherapeutika entweder inhibitorisch auf Proteine, die eine Rolle bei der DNA-Synthese spielen, oder bilden Addukte mit der DNA, was im Verlauf der Reparatur zu temporären Strangbrüchen führt.

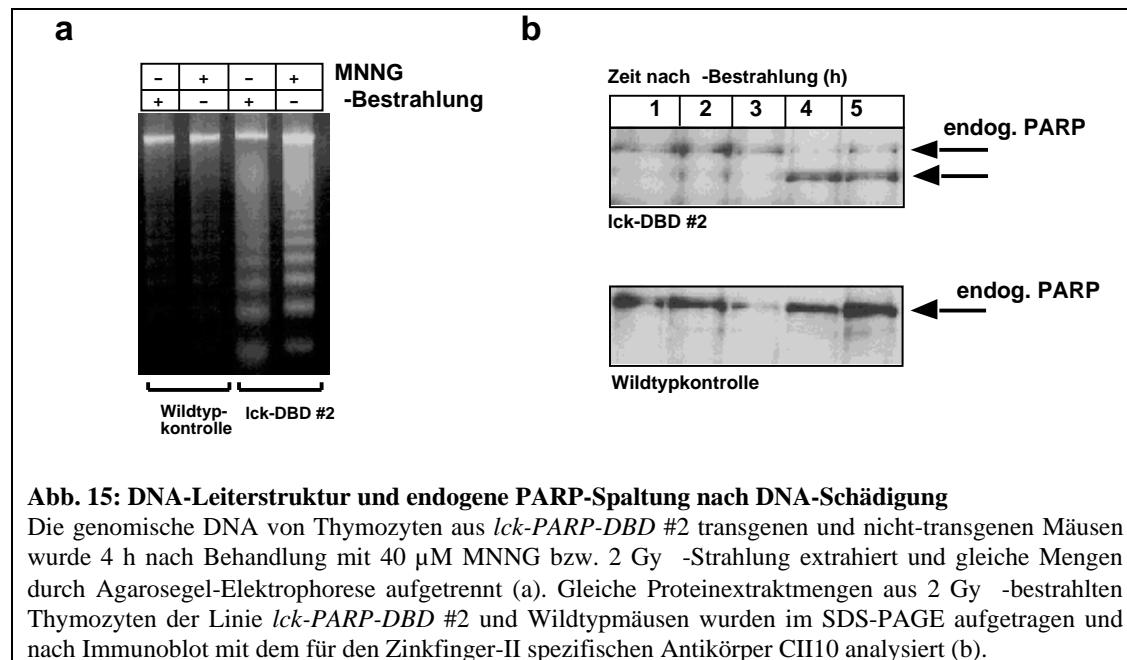
Um die Empfindlichkeit der Thymozyten gegenüber DNA-Schäden unterschiedlicher Genese zu untersuchen, wurden Zellen mit niedrig dosierter Röntgenstrahlung, Etoposid oder MNNG behandelt. Sowohl die Röntgenbestrahlung als auch die Alkylierung der DNA mit MNNG führt vornehmlich zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen. Etoposid hingegen inhibiert die Topoisomerase II bei der Entwindung der DNA-Doppelstränge und soll zu vermehrten Doppelstrangbrüchen führen. Ein nicht reparierter DNA-Doppelstrangbruch ist für die betreffende Zelle letal.



Zur Untersuchung der Apoptose wurden die Thymozyten 6-8 Wochen alter *lck-PARP-DBD* transgener wie auch nicht-transgener Mäuse explantiert, mit 50  $\mu$ M Etoposid, 40  $\mu$ M MNNG oder 2 Gy ionisierender Strahlung behandelt und für 12 Stunden in Kultur genommen. Nach Ethanolfixierung und Propidiumiodidfärbung wurde im FACS der Anteil toter Zellen bestimmt (Abb. 14).

Thymozyten aus den DBD exprimierenden *lck-PARP-DBD* transgenen Linien #1 und #2 zeigten einen deutlichen Anstieg degradiert DNA (sub-G1) nach genotoxischem Stress im Vergleich zu den Zellen aus den *lck-PARP-DBD* transgenen Linien #3 und #4, die sich wie die nicht-transgenen Kontrollzellen verhielten.

Als Nachweis für den beschleunigten Ablauf der Apoptose nach MNNG-Behandlung bzw.  $\gamma$ -Bestrahlung wurde die stärkere nukleosomale Degradation der DNA in den *lck-PARP-DBD* Transgenlinien #1 und #2 durch Agarosegel-Elektrophorese als Leiterstruktur sichtbar gemacht (Abb. 15a).



Ein weiteres Indiz für die beschleunigte Apoptose nach genotoxischem Stress in den beiden DBD hoch exprimierenden Transgenlinien *lck-PARP-DBD* #1 und #2 ist die schneller einsetzende Spaltung der endogenen PARP. Das als früher Apoptose-Indikator dienende 89 kDa carboxyterminale Fragment der PARP wurde im Immunoblot durch den für den Zinkfinger-II spezifischen Antikörper CII10 nachgewiesen (Abb. 15b).

Sowohl die „Leiterstruktur“ der genomischen DNA im Agarosegel als auch die PARP-Spaltung im Immunoblot sind deutliche Hinweise für den Apoptosevorgang, der in den Thymozyten aus den transgenen Mäusen der Linien *lck-PARP-DBD* #1 und #2 im Vergleich zu den Kontrollzellen aus nicht-transgenen Mäusen beschleunigt ist.

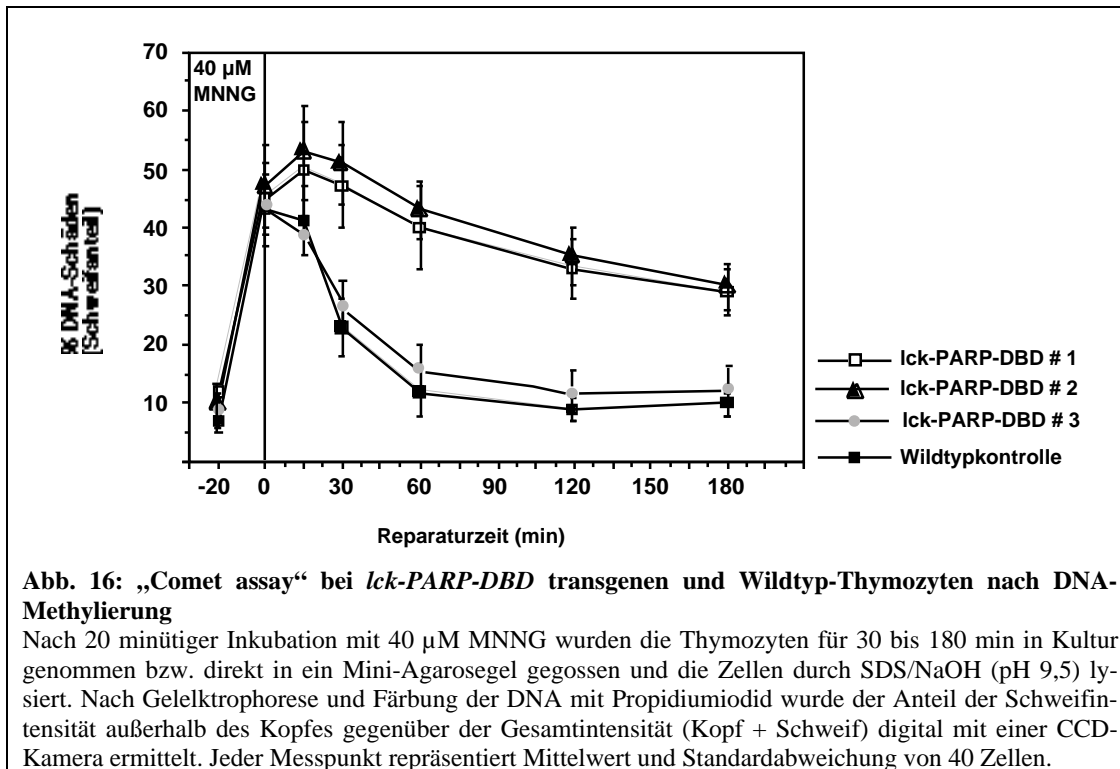
### 2.3 PARP-DBD inhibiert die DNA-Einzelstrangbruchreparatur

Aus *in vitro*-Experimenten mit verschiedenen PARP-Inhibitoren und Untersuchungen an PARP defizienten Mäuse sowie aus Versuchen, Interaktionspartner der PARP zu finden, gibt es deutliche Hinweise, dass die PARP mit der Basen-Exzisions-Reparatur-maschinerie interagiert.

In dem vorliegenden Mausmodell wurde ein inaktives Proteinfragment der PARP in T-Zellen überexprimiert, das die Aktivierung der endogenen PARP durch Verdrängung von induzierten Strangbrüchen inhibieren sollte. Zur Detektion der durch Alkylierung oder Röntgenbestrahlung induzierten und von der Zelle wieder reparierten DNA-Einzelstrangbrüche wurde ein sehr empfindliches Messsystem eingesetzt. Im sogenannten „Comet assay“ wurde die Chromatinkondensation im Zellkern einzelner Zellen nach alkalischer Denaturierung, kurzer Agarosegel-Elektrophorese und Propidiumiodidfärbung mit einer digitalen CCD-Kamera und entsprechender Software gemessen (Müller *et al.*, 1994; Böcker *et al.*, 1997).

Sowohl die Hintergrundschädigung nach 3 Stunden in Kultur, als auch die induzierten DNA-Schäden nach 20 min MNNG-Behandlung frisch explantierter Thymozyten und die daraus resultierende Dekondensierung des Chromatins sind zwischen allen *lck-PARP-DBD* transgenen Linien und den Wildtypkontrollen vergleichbar. Allerdings wird die Regeneration der Chromatinstruktur in den DBD hoch exprimierenden Thymozyten im Verlauf der ersten 2 bis 3 Stunden deutlich gegenüber den DBD niedrig exprimierenden Zellen und der Wildtypkontrolle inhibiert (Abb. 16). Während die Schadenshalbwertszeit in Kontrollthymozyten bei 30 min liegt, wachsen die Schäden in den *lck-PARP-DBD* transgenen Linien #1 und #2 in der gleichen Zeit zum Teil noch an, bzw. werden nach 3 Stunden nur zu einem Drittel repariert. Die Entstehung der DNA-Strangbrüche innerhalb der ersten 20 Minuten der MNNG-Behandlung ist durch die PARP-Inhibierung nicht beeinflusst, aber die gleichzeitig ablaufenden Folgereaktionen wie z. B. Polymerisation und Religation der DNA-Strangbrüche.

Ohne die Fähigkeit Poly(ADP-Ribose) zu bilden, ist die Reparaturkapazität von Thymozyten nach MNNG-Behandlung deutlich verringert.



## 2.4 Kreuzung *lck-PARP-DBD* transgener mit *p53* defizienten Mäusen

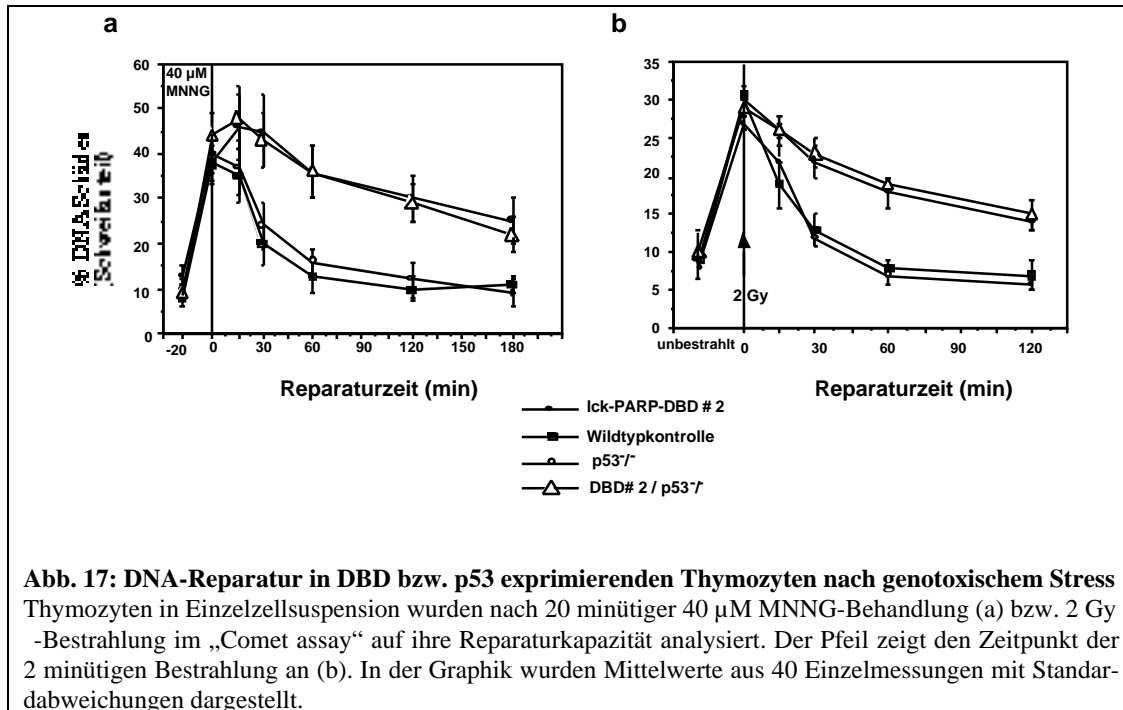
### 2.4.1 Die Basen-Exzisions-Reparatur ist unabhängig von p53

Im „Comet Assay“ zeigte sich eine deutliche Inhibierung der DNA-Reparaturaktivität in DBD hoch exprimierenden Thymozyten nach MNNG-Behandlung gegenüber nicht-transgenen Kontrollen (Abb. 16). Von Interesse war, ob p53 bei der Basen-Exzisions-Reparatur im Zusammenhang mit der blockierten ADP-Ribose-Polymerbildung eine Rolle spielt.

Es sollte überprüft werden, ob die Hemmung der DNA-Exzisionsreparatur durch die Überexpression der PARP-DBD von p53 abhängt. Um dieses zu untersuchen, wurden p53 defiziente Mäuse mit *lck-PARP-DBD* transgenen Tieren gekreuzt und so *lck-PARP-DBD* transgene Tiere hergestellt, die gleichzeitig kein Wildtyp-p53 exprimieren.

Sowohl nach MNNG-Behandlung als auch nach 2 Gy -Bestrahlung zeigten die Thymozyten aus p53 defizienten Mäusen den gleichen Reparaturverlauf wie Wildtypkontrollen. Die Thymozyten aus den Kreuzungstieren *lck-PARP-DBD* / *p53*<sup>-/-</sup> hingegen verhielten

sich wie die einzeltransgenen *lck-PARP-DBD* Kontrollen (Abb. 17). Die Schadenshalbwertszeit betrug in den Thymozyten nicht-transgener Tiere, unabhängig von der p53-Expression, sowohl nach MNNG-Behandlung als auch nach  $\gamma$ -Bestrahlung etwa 30 min. Im Gegensatz dazu erreichten die DBD exprimierenden Zellen die Halbierung ihrer DNA-Schäden gar nicht (a) bzw. erst nach 2 h (b).



**Abb. 17: DNA-Reparatur in DBD bzw. p53 exprimierenden Thymozyten nach genotoxischem Stress** Thymozyten in Einzelzellsuspension wurden nach 20 minütiger 40 µM MNNG-Behandlung (a) bzw. 2 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung im „Comet assay“ auf ihre Reparaturkapazität analysiert. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der 2 minütigen Bestrahlung an (b). In der Graphik wurden Mittelwerte aus 40 Einzelmessungen mit Standardabweichungen dargestellt.

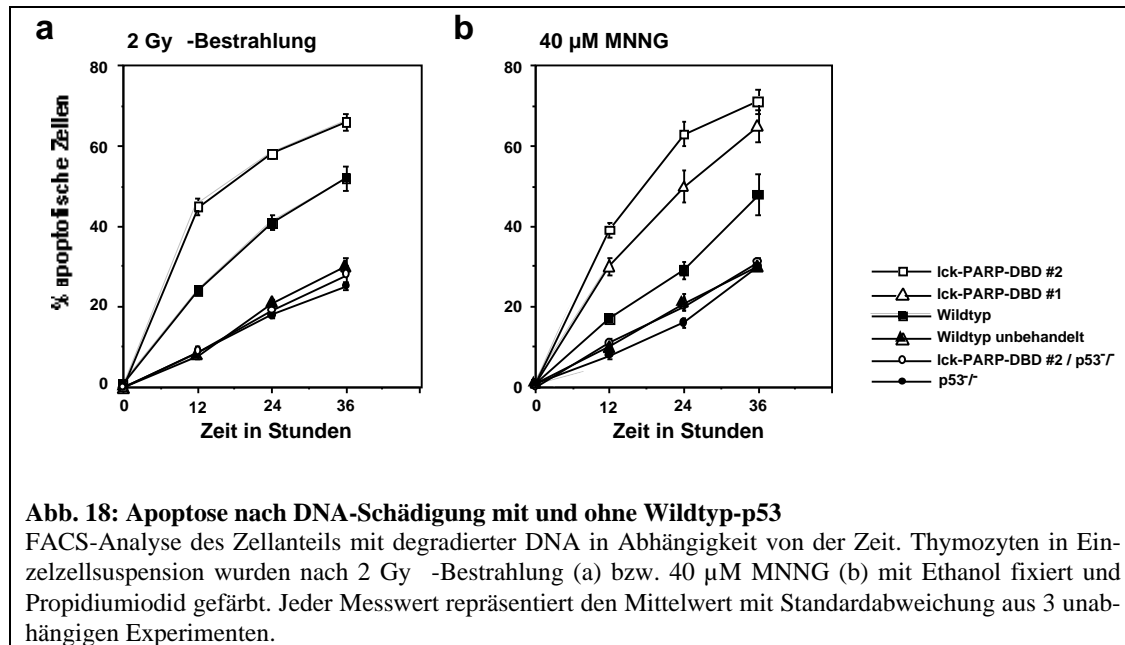
p53 beeinflusst also nicht die hier gemessene Form der DNA-Reparatur. Es besteht bezüglich der DNA-Exzisionsreparatur kein Zusammenhang zwischen der Inhibierung der ADP-Ribose-Polymerbildung und der Funktion von p53.

#### 2.4.2 Die DNA-Strangbruch induzierte Apoptose ist p53 abhängig

Nachdem gezeigt wurde, dass die durch DNA-Strangbrüche induzierte Apoptose in Thymozyten *lck-PARP-DBD* transgener Linien #1 und #2 erhöht ist, sollte geklärt werden, ob diese durch die DBD-Expression verstärkte Apoptose allein von p53 abhängt, oder ob daneben eine p53 unabhängige Form der Apoptose induziert wird.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die am höchsten exprimierende Transgenlinie *lck-PARP-DBD* #2 mit *p53<sup>-/-</sup>* Mäusen gekreuzt. Die PARP-DBD exprimierenden p53 defizi-

enten Thymozyten aus den Kreuzungstieren wurden entweder mit 2 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung, mit 40  $\mu$ M MNNG behandelt oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. In Abständen von 12 Stunden wurden Proben der kultivierten Thymozyten mit Ethanol fixiert. Nach Propidiumiodidfärbung wurde der DNA-Gehalt der Zellen im FACS gemessen. In Abhängigkeit von der Zeit wurde der Anteil der Zellen mit degradiertem DNA analysiert.



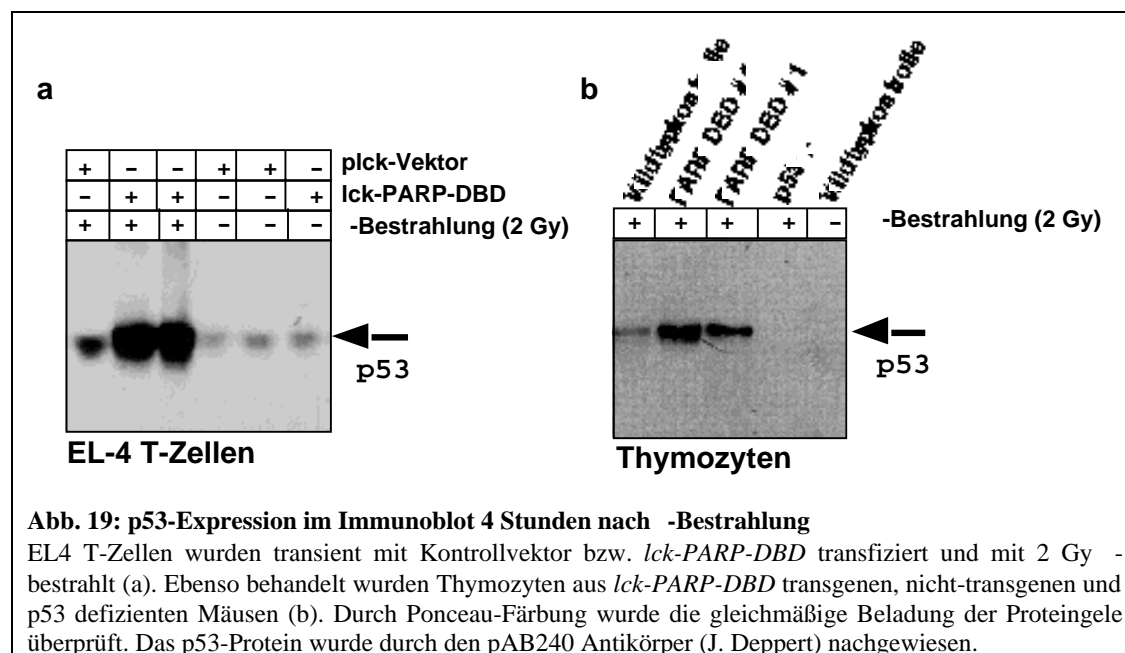
Innerhalb der ersten 12 Stunden sowohl nach 2 Gy  $\gamma$ -Strahlung als auch nach 40  $\mu$ M MNNG-Behandlung war die Apoptoserate von Thymozyten aus einzeltransgenen Mauslinien *lck-PARP-DBD* #1 und #2 doppelt so hoch wie in Wildtypkontrollen. P53 defiziente Thymozyten zeigten weder mit noch ohne DBD-Expression eine Sensitivierung gegen genotoxischen Stress. Die spontane Apoptose war davon nicht betroffen, wie der Vergleich mit unbehandelten Kontrollen zeigte (Abb. 18).

Die erhöhte Apoptoserate nach genotoxischem Stress in PARP-inhibierten Thymozyten der transgenen *lck-PARP-DBD* Linie #2 zeigt eine eindeutige Abhängigkeit von p53. Die DNA-Einzelstrangbruch induzierte Apoptose ist, unabhängig vom *lck-PARP-DBD* Transgenstatus, durch den Ausfall des p53-Proteins vollständig inhibiert. Eine p53 unabhängige Form der Apoptose nach genotoxischem Stress bei DBD-überexprimierenden Thymozyten war nicht nachzuweisen.

### 2.4.3 Die PARP-Inhibierung beschleunigt die Akkumulation von p53

Da die durch DNA-Schäden induzierte Apoptose in Thymozyten von *lck-PARP-DBD* transgenen Mäusen mit Wildtyp-*p53* gegenüber nicht-transgenen Kontrollen viel schneller abläuft und strikt von *p53* abhängt, musste geklärt werden, ob die Aktivität oder die Expression von *p53* in den gegen Apoptose sensitivierten Zellen zunimmt.

Thymozyten, die aus *lck-PARP-DBD* transgenen und nicht-transgenen Mäusen explantiert wurden, wie auch *lck-PARP-DBD* transient transfizierte EL4-Zellen, wurden mit 2 Gy -bestrahlt. Die Proteinextrakte aus den Zellen wurden nach SDS-PAGE und Immunoblot mit dem pAB240 Antikörper auf *p53*-Expression untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass 4 Stunden nach Induktion von DNA-Schäden eine verstärkte Expression des *p53*-Proteins in den PARP-DBD exprimierenden Zellen zu beobachten war. Unbestrahlte Zellen zeigten keine - vergleiche dazu bestrahlte Thymozyten aus *p53* defizienten Mäusen (Abb. 19b) - oder nur sehr schwache *p53*-Expression, wie EL4-Zellen, die mit Kontrollvektor transient transfiziert worden waren (Abb. 19a).



Die Expressionsstärke von *p53* korreliert mit den gemessenen DNA-Strangbrüchen, denn durch die zusätzliche Expression der DBD wird die DNA-Reparatur mangels ADP-Ribose-Polymer inhibiert, und die bestrahlten Zellen akkumulieren über einen längeren



Zeitraum DNA-Schäden. Die Hemmung der ADP-Ribose-Polymerbildung nach genotoxischem Stress korreliert neben der Reparaturhemmung auch mit der erhöhten p53-Expression nach genotoxischem Stress.

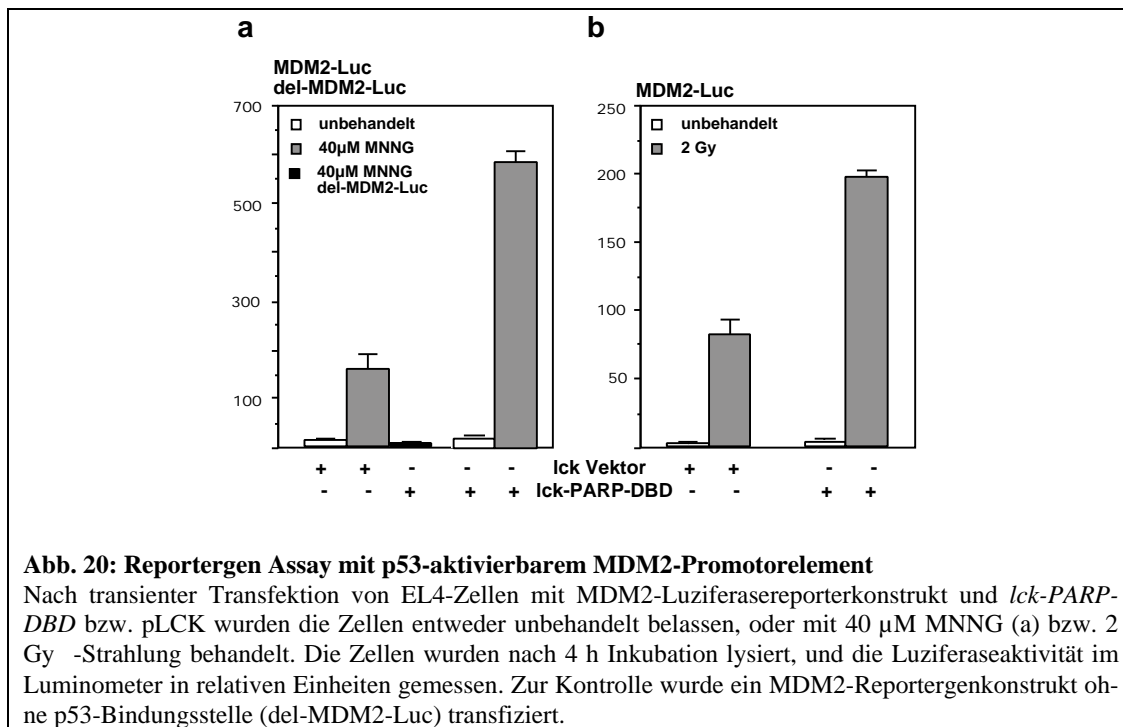
#### **2.4.4 Die p53-Akkumulation korreliert mit verstärkter transkriptioneller Aktivität und erhöhter Bax-Expression**

Sowohl in *lck-PARP-DBD* transient transfizierten EL4 T-Zellen als auch in stabil *PARP-DBD* exprimierenden Thymozyten aus *lck-PARP-DBD* transgenen Mäusen ist die p53-Expression nach Induktion von DNA-Schäden erhöht im Vergleich zu Zellen, die keine *DBD* exprimieren. Eine Konsequenz daraus könnte die verstärkte Expression von p53-Zielgenen sein.

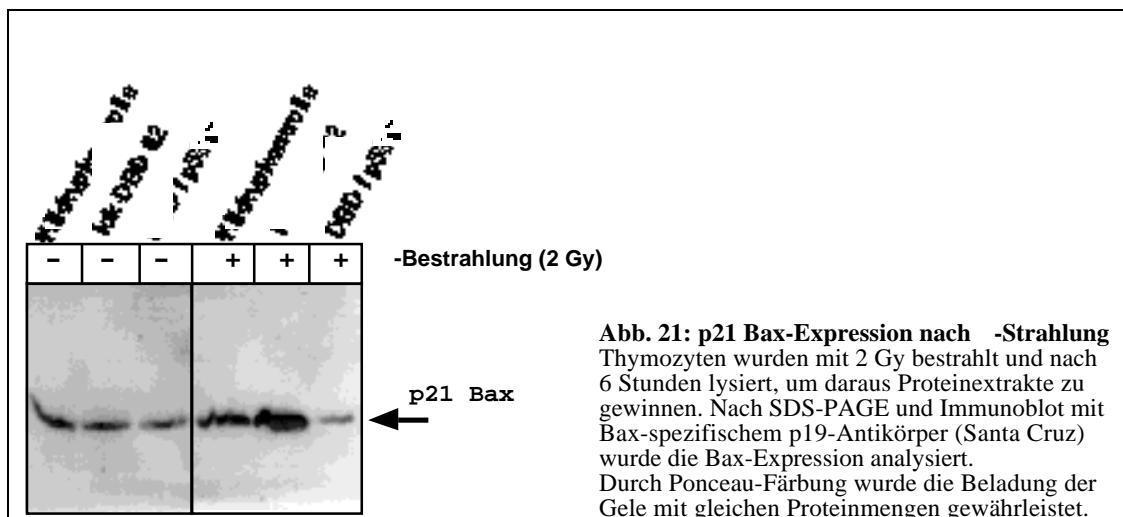
Um diese Frage zu beantworten, wurde zuerst ein Reporter gentest in transient transfizierten EL4-Zellen unternommen. In diesem *in vitro*-System wurde die p53-Aktivität auf einem Reporter genkonstrukt getestet, das ein 350 bp Fragment des MDM2-Intronpromotors mit p53-Bindungsstelle enthält (Zaubermann *et al.*, 1995). Der Promotor treibt die Expression des Luziferasegens, wenn p53 transkriptionell aktiv ist. Zur p53 spezifischen Kontrolle wurde ein Reporter konstrukt transfiziert, das eine deletierte p53-Bindungsstelle im MDM2-Promotor hat. 14 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit 40  $\mu$ M MNNG oder mit 2 Gy  $\gamma$ -Strahlung behandelt. 4 h später wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität im Luminometer in relativen Einheiten gemessen.

Die Lumineszenz stieg in den *lck-PARP-DBD* transfizierten EL4-Zellen auf das 2- bis 4-fache gegenüber den mit Kontrollvektor transfizierten Zellen nach MNNG-Behandlung bzw. Bestrahlung an. Unbehandelte Zellen oder Zellen mit dem deletierten Reporter genkonstrukt zeigten keine Luziferaseaktivität (Abb. 20).

Die verstärkte Apoptose nach genotoxischem Stress in den Thymozyten der transgenen *lck-PARP-DBD* Linien #1 und #2 korreliert mit der vorzeitigen und erhöhten Expression von p53. *In vitro* führte das zur erhöhten p53 spezifischen Reporter genaktivität in EL4-Zellen.



Die Expression von Bax, das als potentiell p53-Zielgen mit der p53 abhängigen Apoptose in Verbindung gebracht wird, wurde *in vivo* untersucht. Thymozyten aus *lck-PARP-DBD* transgenen bzw. Kontrollmäusen, die entweder das p53-Wildtypgen trugen oder p53 defizient waren, wurden mit 2 Gy bestrahlt. Nach 4 Stunden wurden die Zellen lysiert und Proteinextrakte präpariert.



Nach SDS-PAGE und Immunoblot mit dem p21 Bax spezifischen Antikörper konnte eine Erhöhung der Bax-Expression nach -Bestrahlung gezeigt werden. Dabei war die Ex-

pressionstärke zum einen davon abhängig, ob die bestrahlten Thymozyten Wildtyp-p53 exprimierten oder nicht. Zum anderen korrelierte die schnellere Apoptose in DBD und p53 exprimierenden Thymozyten mit einer erhöhten Bax-Expression im Vergleich zu Wildtypkontrollen (Abb. 21).

Eine erhöhte Bax-Expression korrelierte mit der zuvor gezeigten p53-Induktion nach 2 Gy -Bestrahlung in Thymozyten *lck-PARP-DBD* transgener Mäuse und in Kontrollthymozyten. Je stärker die p53-Induktion war (Abb. 19), desto höher war auch die Bax-Expression (Abb. 21).

## 2.5 *lck-PARP-DBD /Eμ-Bcl-2* doppeltransgene Mäuse sind Apoptose resistent

Bcl-2 ist dafür bekannt, dass es in Thymozyten Apoptose hemmen kann, selbst wenn diese durch z. B. Dexamethason, Etoposid, aber auch -Bestrahlung ausgelöst wird (Veis *et al.*, 1993). Der antiapoptotische Effekt durch Bcl-2 ist der Funktion von p53 nachgeschaltet und inhibiert unmittelbar die durch Cytochrom C vermittelte Aktivierung der Caspasekaskade (Vander Heiden *et al.*, 1999; Übersicht bei Green & Reed, 1998; Adams & Cory, 1998; Yang *et al.*, 1998).

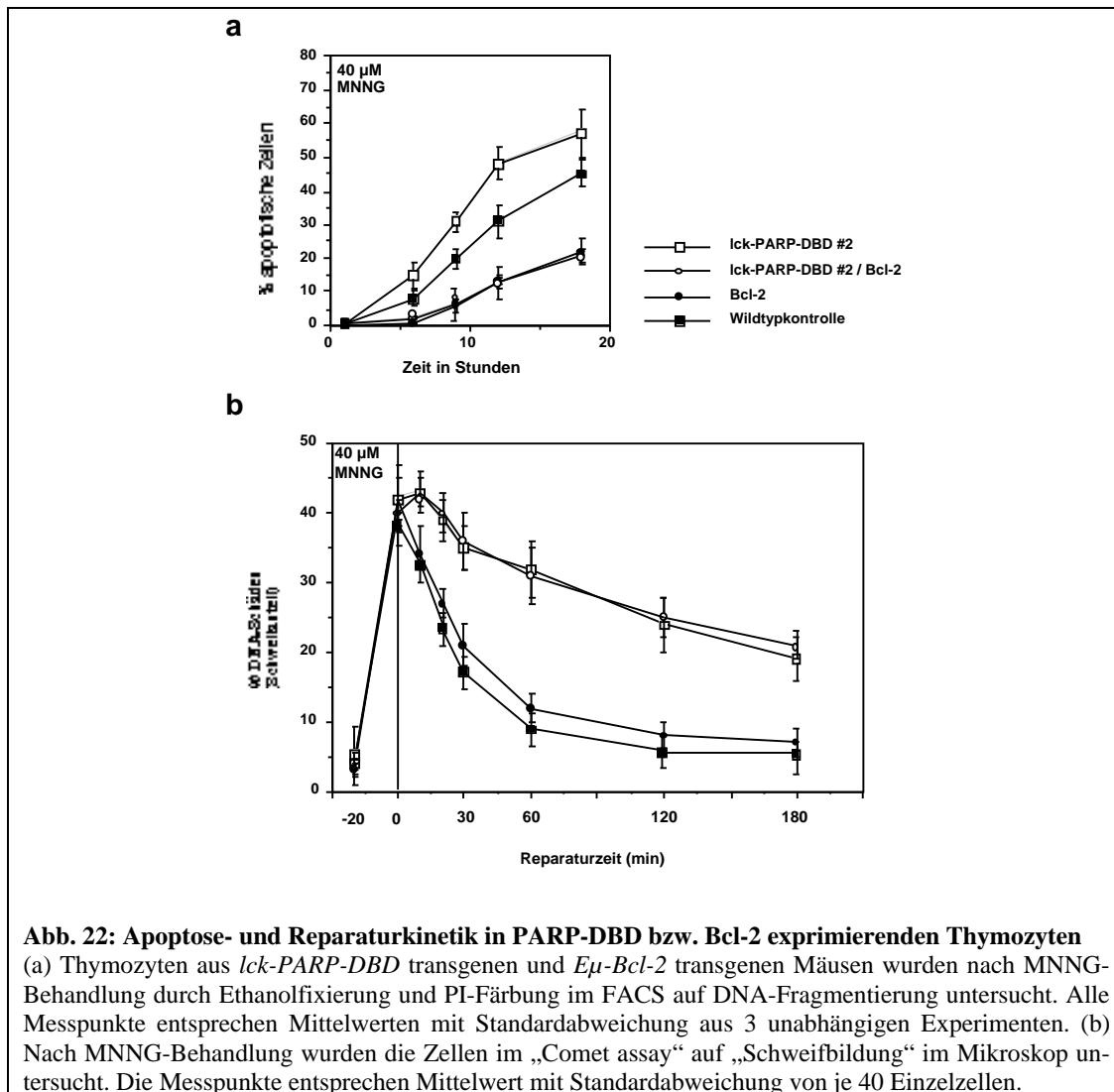
Parallel zur Kreuzung mit p53 defizienten Mäusen wurden *lck-PARP-DBD* transgene Tiere mit einer *Eμ-Bcl-2* transgenen Mauslinie gekreuzt. *Eμ-Bcl-2* transgene Mäuse exprimieren das antiapoptotische Gen *Bcl-2* unter Kontrolle des Enhancers für die schwere Kette der Immunglobulingene in allen Lymphozyten der B- und T-Zelllinie. Mit diesen Kreuzungstieren sollte überprüft werden, ob die Apoptose in Thymozyten *lck-PARP-DBD* transgener Tiere durch Bcl-2 vollständig inhibiert werden kann.

Nach Alkylierung oder Bestrahlung der Thymozyten wurden sie für 18 Stunden in Kultur genommen. In unterschiedlichen Zeitabständen wurden Proben daraus mit Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen im FACS nach Propidiumiodidfärbung auf ihren DNA-Gehalt analysiert.

Auch 18 Stunden nach Alkylierung mit 40 μM MNNG waren die Thymozyten der *lck-PARP-DBD / Eμ-Bcl-2* doppeltransgenen Mäuse gegen Apoptose durch DNA-Schäden geschützt. Es war im Gegensatz zu den Thymozyten aus Wildtyp- bzw. *lck-PARP-DBD* einzeltransgenen Tieren kein Unterschied in der Apoptoserate feststellbar (Abb. 22a).

Der Effekt der Apoptosesensibilisierung nach MNNG-Behandlung oder -Bestrahlung bei Thymozyten *lck-PARP-DBD* transgener Tiere wurde durch das Einkreuzen von *Eμ-*

*Bcl-2* aufgehoben. Die p53 abhängige Apoptose in Thymozyten *lck-PARP-DBD* transgener Tiere nach genotoxischem Stress wird vollständig durch *Bcl-2* gehemmt. Eine *Bcl-2* unabhängige Apoptose konnte nicht nachgewiesen werden.



Nach Alkylierung mit 40  $\mu$ M MNNG konnte im „Comet assay“ weder ein Unterschied bei der Höhe der induzierten DNA-Schäden, noch bei der deutlichen Reparaturverzögerung zwischen Thymozyten aus *E $\mu$ -Bcl-2*/*lck-PARP-DBD* doppeltransgenen Tieren und *lck-PARP-DBD* einzeltransgenen Mäusen festgestellt werden (Abb. 22b). Thymozyten aus *E $\mu$ -Bcl-2* einzeltransgenen Mäusen zeigten im „Comet assay“ keine Veränderungen bezüglich der DNA-Reparatur im Vergleich zu Wildtypzellen.

Wie erwartet hatte die Expression von *Bcl-2* keinen Effekt auf die Reparaturkapazität.

### 3 DISKUSSION

Die Schädigungen des Genoms durch exogene und endogene Faktoren bedeutet eine potentielle Bedrohung der Stabilität der Erbinformation. Im Hinblick auf die dadurch mögliche Deregulierung der Genexpression und des Zellzyklus hat die Zelle spezielle Mechanismen entwickelt, die verschiedene Typen von DNA-Schäden spezifisch erkennen und reparieren, aber auch solche, die für den programmierten Zelltod verantwortlich sind. In dieser Arbeit sollte Näheres zur Rolle der PARP bei der DNA-Exzisions-Reparatur und bei der Apoptose nach Induktion von DNA-Schäden in Thymozyten untersucht werden.

Der Ansatz zur Inaktivierung der endogenen PARP durch die Überexpression einer enzymatisch inaktiven DNA-Bindungsdomäne der PARP stellt eine Alternative zur Gen-Inaktivierungsstrategie anderer Gruppen dar (Wang *et al.*, 1995; de Murcia *et al.*, 1997). Die Daten aus den verschiedenen PARP defizienten Mäusen weisen daraufhin, dass Restpolymer von einem anderen PARP-ähnlichen Enzym, wie der PARP-2, gebildet wird (Shieh *et al.*, 1998; Amé *et al.*, 1999) und die Methoden und Ergebnisse bezüglich Reparatur und Zelltod (de Murcia *et al.*, 1997; Trucco *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 1998; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998b; Wang *et al.*, 1995; 1997), insbesondere unter Berücksichtigung der Rolle von p53 (de Murcia *et al.*, 1997; Agarwal *et al.*, 1997; Wesierska-Gadek *et al.*, 1999a und 1999b; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999c), entweder nicht vergleichbar oder kontrovers sind. In der Gen-Inaktivierungsstrategie durch homologe Rekombination von de Murcia *et al.* bleibt fraglich, ob nach Insertion der Neomycin-cDNA als Selektionsmarker in das 4. PARP-Exon unter Umständen ein aminoterminales Fragment der PARP exprimiert werden könnte, das mit dem Zinkfinger-I DNA bindende Fähigkeit hat. Allerdings wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass in PARP defizienten Mäusen kein residuales PARP-Protein oder ein Abbruchprodukt entsteht (Trucco *et al.*, 1998).

### 3.1 Das *lck*-PARP-DBD transgene Maussystem

In dem hier untersuchten transgenen Mausmodell wurde der *lck*-Promotor verwendet, um die Expression der PARP-DBD exklusiv in T-Zellen zu erreichen. In Experimenten mit PARP-DBD stabil exprimierenden Zelllinien konnte eine effiziente enzymatische Inhibition der endogenen PARP nachgewiesen werden (Küpper *et al.*, 1990). In der Tat ist im vorliegenden Transgenmodell durch sehr hohe Expression des Transgens in Thymozyten (Abb. 9) die Polymerbildung nach genotoxischem Stress nicht mehr nachweisbar (Abb. 12). Insofern war die Strategie der Expression einer DNA-Bindungsdomäne als dominant negative Mutante erfolgreich.

PARP als Enzym, das an DNA-Strangbrüche bindet und dadurch aktiviert wird, könnte in Thymozyten eine Rolle bei der Umgruppierung der TCR-Gene durch V(D)J-Rekombination spielen. Allerdings zeigten die Entwicklungsstadien im Thymus keine auffälligen Abweichungen, insbesondere nicht beim Übergang der CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>-Population zu der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Population, in denen unter anderem die Umgruppierung der TCR-Gene stattfindet (Abb. 10). Somit scheint PARP *per se* bei der Umgruppierung der TCR-Gene keine Rolle zu spielen, obwohl DNA-PK defiziente Mäuse (SCID) durch das Einkreuzen von PARP defizienten Mäusen eine Teilwiederherstellung der T-Zellentwicklung von 1 % aufweisen (Morrison *et al.*, 1997). Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit p53 defizienten SCID-Mäusen (Bogue *et al.*, 1996; Guidos *et al.*, 1996; Nacht *et al.*, 1996). Beide Befunde deuten darauf hin, dass erstens die Funktion von DNA-PK im Gegensatz zu PARP bei der V(D)J-Rekombination unverzichtbar ist, zweitens sowohl PARP als auch p53 eine inhibitorische Kontrollfunktion bei der „illegitimen“ Rekombination haben und drittens die Apoptose nach Ausfall von DNA-PK in diesen Zellen durch PARP bzw. p53 gefördert werden könnte. Die „illegitime“ - weil sequenzunspezifische - Rekombination spielt aber bei der TCR-Umgruppierung keine bzw. nur eine artifizielle und untergeordnete Rolle.

In kultivierten sich teilenden Fibroblasten aus PARP defizienten Mäusen wurde nach genotoxischem Stress ein deutlicher G2/M-Arrest des Zellzyklus und eine erhöhte Apoptoserate gemessen (*de Murcia et al., 1997; Trucco et al., 1998*). Aus Interaktionsstudien sind Wechselwirkungen von PARP mit der Reparatur- und Replikationsmaschinerie der Zelle bekannt (*Simbulan et al., 1993; Masson et al., 1998; Dantzer et al., 1998*). Im hier beschriebenen *lck-PARP-DBD* transgenen Modell sind die Thymozyten zwar zu 97 % in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert, aber periphere T-Zellen können durch Stimulierung des TCR/CD3-Komplexes zur Proliferation angeregt werden (*Baroja et al., 1989; Sakai et al., 1993*).

*In vitro*-Stimulation isolierter peripherer T-Lymphozyten durch ConA und Messung der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation zeigten, dass die Überexpression der PARP-DBD keine messbare Verzögerung der DNA-Synthese in T-Zellen bewirkt (Abb. 11). Nach DNA-Schädigung konnte kein G2/M-Arrest im FACS gemessen werden, nur eine Beschleunigung der Apoptose (Daten nicht gezeigt). Hier mag die Messmethode noch nicht sensitiv genug gewesen sein. *In vivo*-Daten von stimulierten peripheren T-Zellen nach SEB-Injektion (Staphylokokken Enterotoxin B) in *lck-PARP-DBD* transgene Mäuse werden mehr Aufschluss darüber geben, ob die PARP-Inhibition hemmenden Einfluss auf die Proliferation aktivierter T-Zellen hat.

Im Maustumormodell konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Beschleunigung von lymphoiden Neoplasien durch Überexpression der PARP-DBD in T-Zellen der Kreuzung von *lck-PARP-DBD* #1 bzw. #2 mit p53 defizienten oder *Eμ-Bcl-2* transgenen Linien nachgewiesen werden (*Marin et al., 1994*). Da aber bekannt ist, dass *PARP*<sup>-/-</sup>-Mäuse aus den beiden Labors *de Murcia* und *Wang* chromosomale Aberrationen aufweisen (*Simbulan-Rosenthal et al., 1999a; Wang et al., 1997*), wäre zu erwarten gewesen, dass durch den Ausfall der PARP-Funktion schneller Tumoren entstehen. Die Penetranz dieser dominant negativen Mutation durch die DBD-Überexpression scheint für die Tumorentstehung im Laufe der untersuchten 12 Monate nicht auszureichen.

### 3.2 Funktion von PARP und Poly(ADP-Ribose) bei der DNA-Exzisions-Reparatur

Da für die PARP Funktionen bei der Bindung und Reparatur von DNA-Strangbrüchen und damit zum Erhalt der genomischen Stabilität bekannt sind, ist es nicht überraschend, dass verschiedene Ansätze, die PARP zu hemmen, Reparaturdefekte zeigen und zu chromosomalen Aberrationen führen. Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen zur Funktion der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase bei der DNA-Reparatur haben gezeigt, dass die Hemmung der PARP durch chemische Inhibitoren wie 3-AB, oder die fehlende Expression durch homologe Rekombination bzw. Antisense-mRNA-Expression, zur Verzögerung der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen führt (*Berger et al., 1987; Ding et al., 1992; Cloutier et al., 1998; Trucco et al., 1998*). Im Gegensatz dazu stehen die Befunde aus indirekten *in vitro*-Assays mit Reportergenplasmiden, die keine Inhibierung der Reparatur in Fibroblasten aus *PARP*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten (*Wang et al., 1997*). Allerdings bleibt in diesem Fall offen, ob ein Test basierend auf der Funktionalität eines Reportergens empfindlich und spezifisch genug ist, um die Reparaturkapazität in diesem Bereich zu detektieren.

Mit einem auf die Anforderungen abgestimmten sogenannten „Comet Assay“ wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Überexpression einer dominant negativen PARP-Mutante, die an DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche gleichermaßen bindet (*Gradwohl et al., 1990; Ikejima et al., 1990*), aber keine Polymeraseaktivität besitzt, die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen nach Methylierung oder Röntgenbestrahlung deutlich inhibiert (Abb. 16). Allerdings kann mit dem „Comet Assay“ nicht vollkommen geklärt werden, auf welche Weise PARP-DBD die DNA-Reparatur hemmt und ob aus der Reparaturhemmung auf eine physiologische Rolle der PARP bei der DNA-Reparatur geschlossen werden kann.

Die endogene PARP modifiziert unter anderem Histone und sich selbst nach Bindung an DNA-Strangbrüche durch Poly(ADP-Ribosyl)-ierung. Durch elektrostatische Abstoßung



des negativ geladenen Polymers könnten die modifizierten Komponenten von der DNA im Bereich des Strangbruchs abdissoziieren - unter anderem auch PARP. Zur Erläuterung sei auf das Histon-shuttle-Modell nach *Althaus* in der Einleitung verwiesen (Abb. 3). Die DBD hingegen könnte den Zugang für die „nachfolgend“ bindenden Reparaturenzyme sterisch inhibieren und so den beobachteten Effekt der Reparaturhemmung bewirken. Diese plausible Erklärung würde auch auf die Daten aus Experimenten mit PARP-Inhibitoren (3-AB) zutreffen (*Berger et al., 1987; Petersen et al., 1997; Cloutier et al., 1998*).

Als alternative Vorstellung wäre aber auch denkbar, dass es durch die fehlende Polymerbildung in Zellen, die PARP-DBD überexprimieren, gar nicht erst zur Auflockerung des Chromatins um die Bruchstelle herum kommt und dadurch der Ablauf der Reparatur gestört wird (*Althaus et al., 1999; De Capoa et al., 1999*). Die Thymozyten der transgenen Linie *lck-PARP-DBD #3*, welche die DBD schwächer exprimieren, zeigten trotz relativer Überexpression der DBD (Abb. 9a) und partieller Inhibierung der enzymatischen Aktivität der endogenen PARP (Abb. 12) keine Reparaturverzögerung (Abb. 16). Eine bloße Überexpression der DNA-Bindungsdomäne um den Faktor 3 gegenüber der endogenen PARP müßte statistisch genügend freie DNA-Enden besetzen, um eine damit linear korrelierende Verzögerung der „Sofortreparatur“ in den ersten 10 bis 30 Minuten nachweisen zu können. Das ist aber nicht der Fall. Vielmehr genügt eine vergleichsweise geringe Restaktivität der endogenen PARP in den Thymozyten der transgenen Linie *lck-PARP-DBD #3*, um den ungestörten Ablauf der Reparatur zu ermöglichen. Die durch den spezifischen Antikörper 10H nachgewiesenen Restmengen an Polymer in der *lck-PARP-DBD* transgenen Linie #3 scheinen auszureichen, um das Chromatin aufzulockern und die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) ablaufen zu lassen.

Das ist ein Hinweis dafür, dass die DBD nicht irreversibel an den DNA-Bruchstücken „klebt“, sondern in einem dynamischen Gleichgewicht von der DNA wieder abdissoziiert. Dass dieses Phänomen auch für die „Volllängen“-PARP gilt, haben frühere *in vitro*-Replikationsstudien gezeigt, in denen PARP nur bei zusätzlicher Anwesenheit von PCNA und DNA-Polymerase von freien DNA-Enden abdissoziiert, während Polyme-

rase /Primase allein nicht ausreichen (Eki & Hurwitz, 1991). Beide, PCNA und Polymerase partizipieren bei der Basen-Exzisions-Reparatur und interagieren mit PARP bzw. werden poly(ADP-Ribosyl)-iert (Eki, 1994; Coll et al., 1997).

Unterstützt wird die Hypothese der Korrelation zwischen DNA-Reparaturdefekt und fehlendem ADP-Ribose-Polymer zusätzlich durch Daten aus Untersuchungen mit PARP defizienten Zellen. Sowohl Antisense- als auch Gen-Inaktivierungsstrategien zeigten nach genotoxischem Stress Reparaturdefekte *in vitro* bzw. genomische Instabilität *in vivo* (Trucco et al., 1998), die nicht auf eine irreversible Bindung an offene DNA-Enden durch eine inaktive PARP zurückzuführen sind.

Nicht zuletzt scheint die unmittelbar durch DNA-Schäden induzierte Signaltransduktion in den Thymozyten, die die PARP-DBD überexprimieren, nicht durch ein Maskieren der freien DNA-Enden mit der DNA-Bindungsdomäne gestört zu sein. Im Gegenteil, die Akkumulation von p53 und die Aktivierung p53 abhängiger Mechanismen wie Transkription und Apoptose ist nach genotoxischem Stress sogar deutlich forciert (Abb. 18, 19, 20 und 21). Das könnte auf vermehrt persistierende Strangbrüche während der Akutphase der BER zurückgeführt werden, aber auch auf fehlende Interaktionen zwischen p53, PARP und dem ADP-Ribose-Polymer, die kontrovers diskutiert werden (Wesierska-Gadek et al., 1996; Kumari et al., 1998; Malanga et al., 1998; Vaziri et al., 1997).

Um die Wirkung und Funktion von p53 auf die PARP abhängige DNA-Einzelstrangbruchreparatur zu untersuchen, wurden  $p53^{-/-}$ -Mäuse mit der transgenen Linie *lck-PARP-DBD #2* gekreuzt. Die  $p53^{-/-}$ -Thymozyten zeigten nach niedrig dosierter MNNG- bzw. Röntgenbehandlung in ihrer Reparaturkapazität keine Beeinträchtigung. Auch die Kombination von vollständiger PARP-Hemmung im Zusammenhang mit dem Ausfall von p53 zeigte keine Abweichung im Phänotyp der Reparaturdefizienz von den Thymozyten aus *lck-PARP-DBD* einzeltransgenen Mäusen (Abb. 17). Das läßt eine Rolle von p53 in dem Basen-Exzisions-Reparaturweg als unwahrscheinlich erscheinen.

### 3.3 Dominant negative PARP-DBD und Apoptose in Thymozyten

Spätestens seitdem bekannt ist, dass Poly(ADP-Ribose)-Polymerase während des Ablaufs der Apoptose in verschiedenen Zellsystemen nach Caspaseaktivierung in einen 24 kDa Aminotermminus und einen 89 kDa Carboxyterminus spezifisch gespalten wird, untersucht man die genauere Funktion von PARP beim programmierten Zelltod.

Nach Aktivierung durch DNA-Strangbrüche setzt PARP den Zellvorrat an  $\text{NAD}^+$  zu Poly(ADP-Ribose) um. Der  $\text{NAD}^+$ -Vorrat wird über den Verbrauch von ATP wieder regeneriert. Für den Untergang der Zelle scheinen nicht induzierte DNA-Strangbrüche der entscheidende Auslöser zu sein, sondern der katastrophale ATP-Verlust. Dieser Befund spricht nach heutigen Kenntnissen über die ATP-Abhängigkeit der Apoptose eher für den Zelltod in Form von Nekrose in  $\text{NAD}^+$ -depletierten Zellen nach genotoxischem Stress (Nosseri *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1995; Hyo & Snyder, 1999).

Allerdings sind die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Untersuchung von Apoptose und Nekrose in Zellen verschiedener Gewebe - abhängig vom Stimulus - zum Teil sehr widersprüchlich. Im Tiermodell wurden mittlerweile drei PARP defiziente Mausstämme generiert, die alle unterschiedliche Deletionen aufweisen: Wang *et al.* deletierten Exon 2 (1995), de Murcia *et al.* Exon 4 (1997) und Masutani *et al.* Exon 1 (1999).

Neuronale Zellen aus  $\text{PARP}^{-/-}$ -Mäusen von Wang *et al.* sind gegen Hypoxie resistent (Endres *et al.*, 1997; Eliasson *et al.*, 1997; Love *et al.*, 1999a; 1999b), genauso wie  $\beta$ -Inselzellen des Pankreas gegen Streptozotocin, das DNA-Schäden durch Alkylierung bzw. Oxidierung auslöst (Heller *et al.*, 1995; Burkart *et al.*, 1999; Pieper *et al.*, 1999). Untersuchungen an Fibroblasten aus  $\text{PARP}^{-/-}$ -Mäusen von Wang *et al.* haben gezeigt, dass diese Zellen kein stabiles Wildtyp p53-Protein bilden und gegenüber  $\gamma$ -Strahlung und Fas-induzierter Apoptose resistent sind (Wang *et al.*, 1998; Wesierska-Gadek *et al.*, 1999a; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998b). Nach Rekonstitution der PARP-Expression durch Transfektion der PARP-cDNA in die Fibroblasten zeigten die Zellen eine teilweise Wiederherstellung der p53-Expression und Sensitivität gegenüber genotoxischem Stress (di Fagagna *et al.*, 1999).

Diese Resistenz bezieht sich nicht auf die Induktion von DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffradikale oder Alkylgruppen, sondern auf den plötzlichen Abfall von  $\text{NAD}^+$  und im Zuge damit auch der ATP-Konzentration in der Zelle. Die untersuchten PARP-defizienten Zellen sind vor der schlagartigen  $\text{NAD}^+$ -Depletion geschützt und überleben genotoxischen Stress.

Ganz im Gegensatz dazu sind Zellen aus *PARP*<sup>-/-</sup>-Mäuse von *de Murcia et al.* empfindlicher gegenüber  $\gamma$ -Strahlung und Fas-induzierter Apoptose. Sowohl T-Zellen und Dünndarmepithelzellen, als auch Fibroblasten aus diesen Mäusen sind strahlungssensitiver und zeigten eine damit verbundene p53-Stabilisierung, die im Vergleich zu den Wildtypkontrollen erhöht war (*de Murcia et al., 1997*). Nach Transfektion der PARP-cDNA bzw. einer Caspase-resistenten PARP-Mutante zeigten *PARP*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten entweder eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps bzw. eine Verzögerung des Zelltods (Caspase-resistente Mutante) nach Aktivierung von Fas (*Oliver et al., 1998*).

Allerdings deuten neuere Ergebnisse darauf hin, dass die *PARP*<sup>-/-</sup>-Mäuse nach LPS-Injektion (Lipopolysaccharide aus Bakterienmembranen) gegen eine überschießende Immunantwort mit nachfolgendem Schock resistent sind (*Oliver et al., 1999*). Hierbei wird ein Defekt bei der Induktion der NO-Synthese in Abhängigkeit von NF- $\kappa$ B und PARP diskutiert. Ein NO-Anstieg kann in Wildtypzellen zu DNA-Schäden und nach PARP-Aktivierung zu  $\text{NAD}^+$ -Depletion und Nekrose führen. Der Defekt deutet daraufhin, dass PARP nicht nur eine Funktion bei der Regulation von Mechanismen hat, die bei DNA-Schäden wirksam sind, sondern auch bei der Induktion von Genen nach spezifischen Stimuli in bestimmten Zelltypen eine transkriptionelle Rolle spielen könnte.

Nach Zusammenfassung der kontroversen Ergebnisse in verschiedenen Zellsystemen wurde in der vorliegenden Arbeit mit der *lck*-Promotor regulierten Expression der DNA-Bindungsdomäne von PARP eine Transgenstrategie gewählt, um am Mausmodell explizit den Zelltod in Thymozyten zu untersuchen. Thymozyten reagieren sehr empfindlich auf

genotoxischen Stress mit p53 abhängiger Apoptose (*Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993*).

Durch die hohe Überexpression der dominant negativen PARP-Mutante konnte die Polymerbildung der endogenen PARP blockiert werden (Abb. 12). Und nur in den hochexprimierenden Thymozyten der transgenen Linien *lck-PARP-DBD* #1 und #2 wurde die Reparatur nach genotoxischem Stress durch Alkylierung oder Oxidation gehemmt (Abb. 16). Die Restpolymerbildung in den niedriger exprimierenden transgenen Linien *lck-PARP-DBD* #3 und #4 (Abb. 12) hatte gegenüber den Wildtypkontrollen keine Auswirkung auf den Beginn und die Progression des Zelltods in Thymozyten (nicht gezeigt). Die früher einsetzende Apoptose in den Thymozyten der Transgenlinien *lck-PARP-DBD* #1 und #2 nach DNA-Schädigung war von p53 abhängig, wie die Kreuzung mit p53 defizienten Mäusen zeigte. Ohne das *p53*-Gen waren die Zellen nach genotoxischem Stress vor Apoptose geschützt (Abb. 18). Desweiteren war die Akkumulation von p53 in den Thymozyten der transgenen Mauslinien *lck-PARP-DBD* #1 und #2 und in der transient transfizierten EL4 T-Zelllinie (Maus) nach  $\gamma$ -Bestrahlung deutlich erhöht (Abb. 18). Die beschleunigte Apoptose nach Induktion von DNA-Schäden ist also nicht nur abhängig von p53, sondern die p53-Akkumulation in den Thymozyten wird durch die indirekte PARP-Hemmung auch verstärkt.

Wie ist diese beschleunigte und verstärkte p53-Akkumulation zu erklären?

Eine Möglichkeit wäre die verlängerte Persistenz von induzierten DNA-Schäden, während der Ablauf der DNA-Exzisions-Reparatur blockiert ist. Das könnte eine höhere Schadensdosis über die Zeit bedeuten, im Gegensatz zu reparaturaktiven Zellen, in denen der Schaden bereits deutlich verringert würde. Diese Hypothese wird durch den im „Comet assay“ gemessenen anhaltenden Anstieg der DNA-Schäden in Thymozyten aus transgenen Mäusen der Linien *lck-PARP-DBD* #1 und #2 innerhalb der ersten 15 Minuten während der Regenerationsphase nach MNNG-Behandlung gestützt (Abb. 16).

Eine zweite Erklärung neben dieser Dosisabhängigkeit für die p53-Akkumulation wäre die direkte oder indirekte Interaktion von p53 mit PARP und dem ADP-Ribose-Polymer. PARP polymerisiert nach Aktivierung durch DNA-Strangbrüche Poly(ADP-Ribose)

kovalent an Proteine des Chromatins, unter anderem auch an p53 und andere Strangbruch signalisierende Proteine wie DNA-PK (*Kumari et al., 1998; Ruscetti et al., 1998*). Vor allem aber wird das Polymer an die Automodifikationsdomäne der PARP selbst geknüpft. Nicht-kovalente Interaktionen des Polymers mit DNA modifizierenden Proteinen - bzw. Proteinen, die den DNA-Status signalisieren, wie z. B. p53 - werden diskutiert (*Malanga et al., 1998*). Auch direkte Protein-Protein-Interaktionen von PARP in Reparaturkomplexen bzw. mit p53 konnten nachgewiesen werden (*Vaziri et al., 1997; Dantzer et al., 1998; Kumari et al., 1998*).

Denkbar wäre nun ein Modell, in dem aktivierte PARP und ihr Polymer für den geordneten Ablauf der Basen-Exzisions-Reparatur eine fördernde Funktion haben, wo aber die Aktivierung von p53 direkt oder indirekt durch die Poly(ADP-Ribosyl)-ierung vorerst verzögert würde. Eine direkte Poly(ADP-Ribosyl)-ierung von p53 könnte unter Umständen die Wechselwirkung mit anderen Proteinen wie z. B. den Ser/Thr-Kinasen ATM und ATR, die p53 nach DNA-Schäden spezifisch an Ser 215 phosphorylieren, erschweren (*Banin et al., 1998; Canman et al., 1998; Tibbetts et al., 1999*). Allerdings sind diese Befunde sehr umstritten (*Blattner et al., 1999*).

Ergänzend dazu wäre denkbar, dass die Homodimerisierung von p53 bzw. seine Bindung an DNA durch negative Ladungsverschiebung am C-Terminus inhibiert und so die Transaktivierung/ Transrepression von p53-Zielgenen durch PARP gehemmt würde (*Kumari et al., 1998; Malanga et al., 1998*). Solche PARP abhängigen Modulationen posttranskriptionaler oder auch posttranslationaler Funktionen von p53 bei der Aktivierung der Apoptose könnten in Erwägung gezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der p53 abhängigen Aktivierung eines Reportergens in EL4-Zellen auch die umstrittene p53 abhängige Bax-Expression in Mausthymozyten (*Kitada et al., 1993; Miyashita et al., 1994; Schmidt et al., 1999; Thornborrow et al., 1999*) nach Induktion von DNA-Schäden untersucht. Sowohl die transiente Transfektion von *lck-PARP-DBD* in EL4 T-Zellen (Abb. 19), als auch die Überexpression der

DBD in den transgenen Thymozyten (Abb. 19) korrelierte mit erhöhter Reporterogen- bzw. Bax-Expression nach Induktion von DNA-Schäden im Vergleich zu Kontrollzellen. Allerdings muss hinzugefügt werden, dass eine p53 abhängige Transaktivierung des *Bax*-Gens im Maussystem auf Grund von *in vivo*-footprint Analysen nicht bestätigt werden kann (Schmidt *et al.*, 1999). Der erhöhte Proteinspiegel von Bax ist allerdings, möglicherweise durch einen posttranslationalen Mechanismus, von p53 abhängig (Abb. 21) und trägt zur Apoptose bei (Brady *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 1997). Weitere p53 abhängige Mechanismen zur Induktion von Apoptose außer der Transkriptionsregulation sind zu erwarten (Caelles *et al.*, 1994).

Eine beschleunigte Aktivierung der p53 abhängigen Signaltransduktion, sei es durch persistierende DNA-Schäden allein, oder in Verbindung mit der fehlenden Interaktion zwischen Proteinen und dem Polymer der PARP bzw. der aktivierten PARP selbst, scheint in den DBD-exprimierenden Thymozyten die Ursache für die erhöhte Sensibilisierung der Zellen gegen genotoxischen Stress zu sein.

Kreuzungen zwischen den transgenen Mauslinien *lck-PARP-DBD* #1 und *Eμ-Bcl-2* zeigten, dass der durch DNA-Schäden induzierte Zelltod in den Thymozyten vollständig von Bcl-2 inhibiert wird (Abb. 22a). Es handelt sich hierbei nicht um die Hemmung von Nekrose wie bei den neuronalen Zellen und  $\beta$ -Inselzellen, die durch den Ausfall der Poly(ADP-Ribose)-Polymeraseaktivität vor  $\text{NAD}^+$ - und ATP-Depletion geschützt sind, sondern tatsächlich um eine Inhibierung der Apoptose, wie durch Nachweis von nukleosomalem DNA-Abbau und PARP-Spaltung in Kontrollzellen gezeigt werden konnte (Abb. 15).

Desweiteren ist nicht auszuschließen, dass die vorhandene endogene PARP noch weitere Funktionen bei der Auslösung und dem Ablauf der Signale zum Zelltod hat. Es sei darauf hingewiesen, dass in den *PARP*<sup>-/-</sup>-Mäusen von *de Murcia et al.* - trotz der erhöhten Strahlensensitivität - nach LPS-Injektion die typischen Entzündungs- und Schocksymptome ausblieben. Es scheint sich dabei *in vivo* um eine Kombination aus transkriptionsabhängigem Defekt bei der NO-Synthese in Makrophagen und dem Erhalt des  $\text{NAD}^+$ -

Spiegels in den Zielzellen der Makrophagen zu handeln (*Oliver et al., 1999*). Weitere koaktivierende Funktionen werden für PARP bei der transkriptionellen Induktion von Zellzyklusfaktoren und DNA-Reparaturenzymen diskutiert (*Simbulan-Rosenthal et al., 1999b*).

Die Trennung der PARP-Funktionen durch die Überexpression der selektiv auf die DNA-Bindung wirkende DBD könnte daher ein großer Vorteil bei der Aufklärung verschiedener Signalwege in unterschiedlichen Zelltypen sein.



## **4 ZUSAMMENFASSUNG**

In dieser Arbeit wurde die Expression der DNA-Bindungsdomäne (DBD) der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) als Funktionsmutante im transgenen Mausmodell - hier speziell im T-Zellkompartiment - als alternatives Konzept zu den bekannten Gen-Inaktivierungsmodellen untersucht. Redundanzeffekte durch eine Genfamilie von verschiedenen PARP könnten damit umgangen werden, um speziell die *in vivo*-Funktion der Polymerbildung in den gegenüber DNA-Schäden empfindlich reagierenden T-Zellen bezüglich DNA-Reparatur, Proliferation, Apoptose und nicht zuletzt Tumorigenese zu untersuchen.

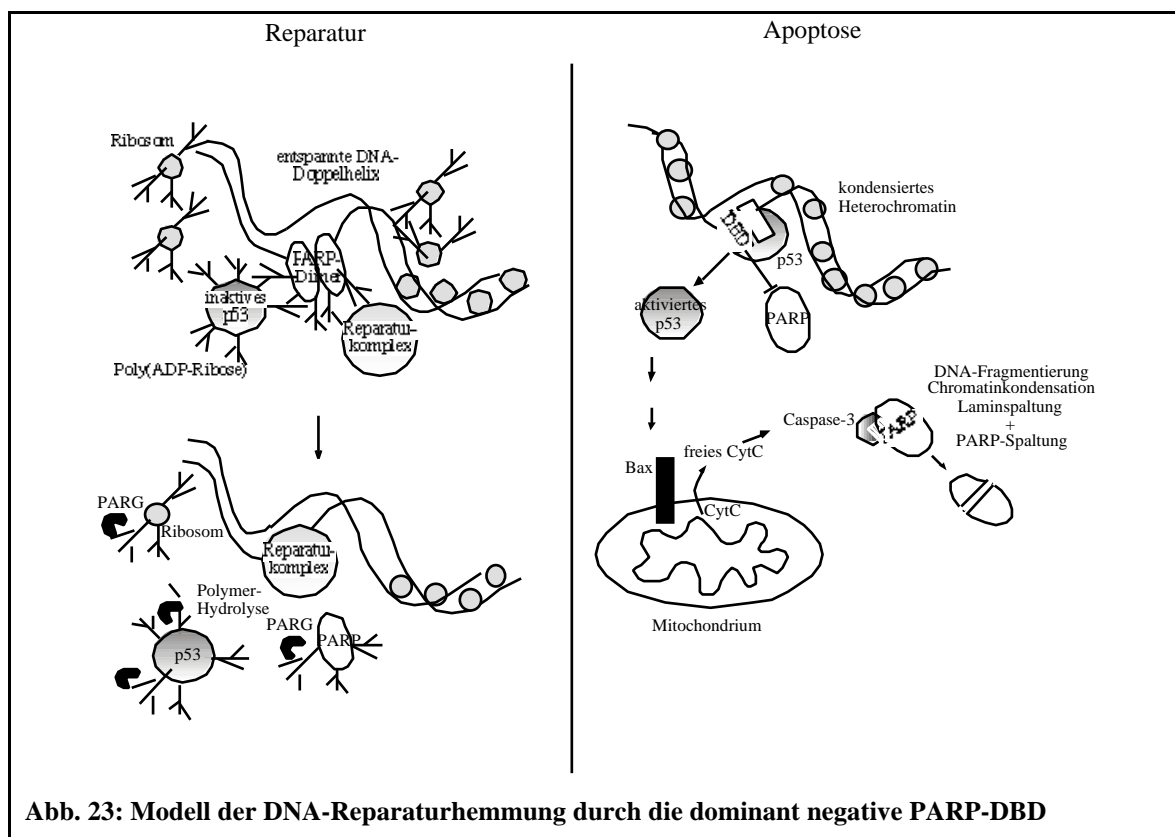
Die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerbildung nach genotoxischem Stress spielt anscheinend für die Entwicklung und Aktivierung der T-Zellen im Thymus und in den peripheren lymphatischen Organen keine Rolle.

Die hier in einem für Chromatinveränderungen durch induzierte DNA-Strangbrüche sehr empfindlichen Nachweisverfahren gezeigten Defekte in Thymozyten aus den transgenen Mauslinien *lck-PARP-DBD* #1 und #2 bei der DNA-Einzelstrangbruch-Reparatur weisen auf die fördernde Funktion des ADP-Ribose-Polymers bzw. der PARP-Aktivität bezüglich der Reparatur hin. Ein nicht zweifelsfrei auszuschließender unspezifischer Reparaturblock durch irreversible Bindung der PARP-DBD an DNA-Strangbrüche ist eher unwahrscheinlich, weil geringe Mengen an Poly(ADP-Ribose) in den Thymozyten der Linien *lck-PARP-DBD* #3 und #4 trotz Überexpression der PARP-DBD bereits ausreichten, diesen Effekt aufzuheben. Kreuzungen mit *PARP*<sup>-/-</sup>-Mäusen aus dem Labor von Wang *et al.* werden helfen, weitere Einzelheiten aufzuklären.

Der beobachtete Reparaturdefekt bei Hemmung der ADP-Ribose-Polymerbildung ging mit beschleunigter p53-abhängiger Apoptose einher. Es konnte gezeigt werden, dass das Tumorsuppressorgen p53 nach genotoxischem Stress in Thymozyten *lck-PARP-DBD* #1 und #2 transgener Mäuse stärker akkumuliert als in Kontrollzellen und eine erhöhte Expression/ Stabilisierung von Bax auf nicht-transkriptioneller Ebene zu bewirken scheint.

Durch Überexpression des „Antiapoptose-Gens“ Bcl-2 wurden die Thymozyten unabhängig von der DBD-Expression vor Apoptose geschützt, zeigten aber weiterhin eine Hemmung der DNA-Reparatur in DBD exprimierenden Zellen.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse legen eine Rolle der PARP bei der DNA-Reparatur nahe. In der daraus entwickelten Modellvorstellung (Abb. 23) hat die Hemmung der ADP-Ribose-Polymerbildung nach genotoxischem Stress eine inhibierende Wirkung auf die Basen-Exzisions-Reparatur und eine wahrscheinlich direkt damit verbundene fördernde Wirkung auf die Apoptose in Thymozyten, die über p53 signalisiert und durch Bcl-2 geblockt wird. Nekrose ist in diesem Zusammenhang auszuschließen, weil es wegen der gehemmten Polymerasefunktion der endogenen PARP zu keiner  $\text{NAD}^+$ -Depletion in der Zelle kommt.



Weiterhin unbeantwortet bleibt die Frage, warum in PARP-depletierten Geweben bisher keine Tumoren festgestellt worden sind.

## **5 MATERIAL UND METHODEN**

### **5.1 Puffer und Lösungen**

Acrylamidlösung	38 % w/v	Acrylamid
	2 % w/v	N,N'-Methylenbisacrylamid
6 x DNA-Probenpuffer	50 % (v/v)	Glycerol
	0,04 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,02 % (w/v)	Xylencyanol
	1 mM	EDTA, pH 8,0
100 x Denhardts	2 % w/v	Ficoll 400
	2 % w/v	BSA
	2 % w/v	Polyvinylpyrrolidon
Ethidiumbromidlösung	50 ng/ml	Ethidiumbromid in TAE
Mini 1	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	Rnase A
Mini 2	0,2 M	NaOH
	1 % (w/v)	SDS
Mini 3	3 M	Kaliumazetat pH 5,5 mit Essigsäure einstellen
MMTB	200 mM	NaCl
	100 mM	Tris-HCl pH 8,0
	5 mM	EDTA pH 8,0
	0,2 % w/v	SDS
Proteinase K-Lösung	0,1 mg/ml	Proteinase K

Prähybridisierungslösung	2 x	SSC
	1 %	SDS
	0,5 %	Magermilchpulver
	0,75 mg/ml	Heringssperma-DNA (10 mg/ml)
		(DNA kurz vor Gebrauch 5 Minuten bei 95 °C denaturieren und dann zugeben)
Hybridisierungslösung	2 x	SSC
	1 %	SDS
	0,5 %	Magermilchpulver
	10 %	Dextransulfat
	0, 5 mg/ml	Heringssperma-DNA (10 mg/ml)
		(DNA kurz vor Gebrauch 5 Minuten bei 95 °C denaturieren und dann zugeben)
TE	10 mM	Tris/HCl pH 7,9
	1 mM	EDTA
TAE	40 mM	Tris/Acetat pH 7,8
	2 mM	EDTA
TBE	90 mM	Tris/Borat pH 8,3
	2 mM	EDTA
TG	8 mM	Tris/HCl pH 8,0
STE	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA
20 x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat
		pH 7,0 einstellen

Sequenziergellösung	6 %	Acrylamid
	0,3 %	Bisacrylamid
	7 M	Harnstoff
		in 1 x TBE
LB-Medium	10 g/l	NaCl
	10 g/l	Caseinhydrolysat
	5 g/l	Hefe- Extrakt
		pH 7,2 mit NaOH einstellen
LB-Agar	15 g/l	Bacto-Agar in LB-Medium
Ampicillin (1000 x)	80 mg/ml	
Kanamycin (1000 x)	25 mg/ml	
WCE-Puffer	50 mM	Hepes pH 7,8
	20 mM	NaF
	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	1 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
	450 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	25 % (v/v)	Glycerol
		Lagerung bei -20 °C
Proteinextrakt-Puffer	50 µg/ml	Aprotinin (SIGMA)
	50 µg/ml	Leupeptin (SIGMA)
	0,5 mM	PMSF (SIGMA)
	1 mM	DTT (LIFE TECHNOLOGIES)
	1 % (v/v)	Nonidet P 40
		in WCE-Puffer
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris/HCl pH 8,8
	0,4 %	SDS

Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris/HCl pH 6,8
	0,4 %	SDS
10 x SDS-Laufpuffer	0,25 M	Tris
	1,9 M	Glycin
	1 %	SDS
2 x SDS-Probenpuffer	100 mM	Tris/HCl pH 6,8
	30 %	Glycerol
	3 %	SDS
	5 %	-Mercaptoethanol
	0,1 %	Bromphenolblau
Rotiphorese Gel 30 (ROTH)	30 %	Acrylamid
	0,8 %	Bisacrylamid
Anodenpuffer 1	300 mM	Tris-Base
	10 %	Methanol pH 10,4 einstellen
Anodenpuffer 2	30 mM	Tris-Base
	10 %	Methanol pH 10,4 einstellen
Kathodenpuffer	40 mM	6-Aminohexansäure
	30 mM	Tris-Base
	10 %	Methanol
		pH 9,4 einstellen
Blotto	3 %	Magermilchpulver in PBS

PBS	137 mM NaCl 2,6 mM KCl 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 6,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,3 einstellen
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium mit 4,5 % (w/v) Glucose, pH 7,0 (LIFE TECHNOLOGIES) mit Glutamin
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium pH 7,0 (LIFE TECHNOLOGIES) mit Glutamin
FBS (FCS)	Fötales Rinder Serum (LIFE TECHNOLOGIES)

Zusatz	Firma	Stammlösung	Verdünnung
Glutamin	Seromed	200 mM in PBS (4 °C)	1 : 100
Penicillin/ Streptomycin	Seromed	10.000 U/10 µg/ml (4 °C)	1 : 100
Nichtessentielle Aminosäuren	Seromed	100 x in PBS (4 °C)	1 : 100
Mercaptoetha- nol	Merck	50 mM in Wasser (39 µl/10 ml Wasser) (-20 °C)	1 : 1000
Etoposid	Sigma	10 mM in DMSO (-20 °C)	1 : 200
Dexamethason	Sigma	10 mg/ml in 70 % Ethanol (-20 °C)	1 : 1000
MNNG	Sigma	0,8 M in DMSO (-80 °C)	1 : 20.000

**Tab. 1: Zusätze zum Kulturmedium**

Einfriermedium A	40 % FBS in Medium
Einfriermedium B	20 % DMSO in Medium
Propidiumiodid/	10 mg/ml PI

Rnase A-Lösung	0,1 mg/ml	Rnase A in PBS
Luziferasepuffer	100 mM	Tris/Acetat pH 7,8
	10 mM	Magnesiumacetat
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
Lysispuffer	1 %	Triton X-100
	1 mM	DTT
		in Luziferasepuffer
Luziferinlösung	66 µM	Luziferin (SIGMA)
	2 mM	ATP
	1 mM	DTT
		in Luziferasepuffer
Low-melt-Agarose (SERVA)	0,1 %	Beschichtung
	0,75 %	Mikro-Gel
2,5 SDS-Lysis-Puffer	87 mM	Natriumlaurylsulfat (SIGMA)
	34 mM	Natriumsarcosinat (SIGMA)
	25 mM	EDTA (SIGMA)
mit	10 N	NaOH auf pH 9,5 eingestellt
TBE-Elektrophorese-Puffer pH 8,4	117 mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MERCK)
	91mM	Borsäure (MERCK),
	2,5 mM	EDTA (SIGMA)
100 ml PI-Lösung	1,2 g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	0,6 g	NaCl (MERCK)
	2 mg	Propidiumiodid (SERVA)
mit	1 N	HCl auf pH 7,5 eingestellt



## **5.2 Molekularbiologie**

### **5.2.1 Verwendete Plasmide**

Zur Klonierung in *E. coli* wurde der pBSKII(-) Blueskriptvektor (STRATAGENE) eingesetzt. Zur Expression in Säugerzellen wurden der pCMV (STRATAGENE), pcDNA 3 (INVITROGEN) und für die Generierung transgener Mäuse der pLCK-Vektor (*Perlmutter et al., 1984*) eingesetzt.

### **5.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung**

(*Sambrook et al., 1989*)

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  bestimmt. Dazu wurden die Nukleinsäuren in der Regel 1:200 in Wasser verdünnt.

$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$  für doppelsträngige DNA

$1 \text{ OD}_{260} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$  für Oligonukleotide

### **5.2.3 Restriktionsverdau**

(*Sambrook et al., 1989*)

Zu analytischen Zwecken wurde  $1 \text{ } \mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen der Firmen Life Technologies, Boehringer Mannheim oder New England Biolabs in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern in einem Volumen von  $20 \text{ } \mu\text{l}$  verdaut. Im Ansatz befanden sich  $0,5\text{-}2,0 \text{ } \mu\text{l}$  des Restriktionsenzym (4-10 U/ $\mu\text{l}$ ). Die Reaktion erfolgte 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$ .

Für präparative Zwecke wurden  $5\text{-}10 \text{ } \mu\text{g}$  Plasmid-DNA in einem Volumen von  $50\text{-}100 \text{ } \mu\text{l}$  2 Stunden lang verdaut. Dazu wurde nie mehr Restriktionsenzym als 10 % des Gesamtvolumens eingesetzt, da zu große Mengen Glycerol den Verdau stören.

#### 5.2.4 Konversion überhängender DNA-Enden

(Cobianchi und Wilson, 1987)

Manchmal war es nicht möglich, den Vektor und das DNA-Fragment („Insert“) mit komplementären, überhängenden Enden zu generieren. Deshalb mußten Enden ohne Überhang („glatte Enden“) erzeugt werden. 5'-Überhänge wurden durch eine Auffüllreaktion, 3'-Überhänge durch eine Abbaureaktion konvertiert. Dafür wurde nach dem Restriktionsverdau dNTP-Mix in einer Endkonzentration von 250 µmol/l und Enzym (siehe unten) zugesetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Auffüllreaktion 2 µl Klenow- Fragment ( 5 U/µl, LIFE TECHNOLOGIES)

Abbaureaktion 2  $\mu$ l T4-DNA-Polymerase (3 U/ $\mu$ l, NEW ENGLAND BIOLABS)

dNTP-Mix	10 mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
----------	-------	------------------------

### 5.2.5 Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden

(Sambrook et al., 1989)

Um eine Religation des Vektors und damit den nicht rekombinanten Hintergrund zu verringern, wurde der zur Religation notwendige 5'-Phosphatrest des Vektors hydrolysiert. Dazu wurde der Restriktionsansatz 15 Minuten vor Beendigung dieser Reaktion mit 0,5 µl Alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm („CIP“, 10 U/µl, NEW ENGLAND BIOLABS) versetzt. Anschließend wurde die Vektor-DNA vom Enzym gereinigt durch „Qiaquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN).

### 5.2.6 Gelelektrophoretische DNA-Auftrennung

(Sambrook et al., 1989)

Restriktionsverdaute DNA wurde in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Fragmentgröße wurden 0,8-2,0 %ige Gele in TAE verwendet. Die Gele wurden mit 0,1-3,0 µg DNA in entsprechender Menge 1 x DNA-Probenpuffer beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-130 V mit TAE als Laufpuffer. Die Gele wurden anschließend 15 min in einer Ethidium-

bromid-Lösung geschwenkt und mit Hilfe des interkalierenden Ethidiumbromids konnte die DNA bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 302 \text{ nm}$  sichtbar gemacht werden. Als Größenmarker wurden pUC und  $\lambda$ -Phagen-DNA (EcoRI/HindIII) verwendet

### 5.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus Agarosegelen ausgeschnitten. Zur Aufreinigung wurde der „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) verwendet. Diese Methode beruht auf der reversiblen, Salz- und pH-Wert-abhängigen Bindung von DNA an Silicagel.

### 5.2.8 Ligation

(Sambrook et al., 1989)

In 20  $\mu\text{l}$  1 x Ligationspuffer (LIFE TECHNOLOGIES) wurden 20-100 ng Vektor-DNA mit drei Äquivalenten DNA-Fragment versetzt. Der Ansatz wurde in Gegenwart von 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase (1 U/ $\mu\text{l}$ , LIFE TECHNOLOGIES) 3 Stunden bei Raumtemperatur oder 12 Stunden bei 16 °C inkubiert.

### 5.2.9 Herstellung kompetenter Bakterien

(Sambrook et al., 1989)

Transformationskompetente *E.coli* DH5<sup>-</sup>-Bakterien wurden nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode hergestellt. Dazu wurden 300 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C, 250 Upm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach Erreichen von  $\text{OD}_{600} = 0,4-0,6$  (logarithmische Wachstumsphase) wurden die Bakterien 20 Minuten auf Eis inkubiert, in 50 ml PP-Röhrchen (GREINER) überführt und zentrifugiert (4 °C, 2500 Upm). Die Bakterienpellets wurden in je 25 ml eiskalter 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation wurden die Bakterien erneut sedimentiert. Die Pellets wurden in je 2 ml der 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Die Suspensionen wurden vereinigt und nochmals 2 Stunden auf

Eis inkubiert. Nach Zugabe von Glycerol in einer Endkonzentration von 20-30 % wurde die Bakteriensuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

#### **5.2.10 Transformation kompetenter Bakterien**

*(Sambrook et al., 1989)*

10 µl eines Ligationsansatzes oder 0,1-10 ng Plasmid-DNA wurden mit 100 µl einer auf Eis aufgetauten Suspension kompetenter Bakterien gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 45 s Hitzeschock bei 42 °C wurden 1 ml LB-Medium zugegeben, und es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Entsprechend des Selektionsmarkers des Plasmids wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **5.2.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus 3 ml-Kulturen**

*(Birnboim und Doly, 1979)*

3 ml LB-Medium mit Antibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden Bakterienstammes angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (250 Upm, 37 °C) inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden sedimentiert (Mikrofuge, 2 Minuten, 14000 Upm). Das Pellet wurde in 150 µl Mini-1-Lösung resuspendiert. Die Bakterien wurden anschließend durch Zugabe von 150 µl Mini-2-Lösung lysiert. Versetzen mit 150 µl Mini-3-Lösung führte zur Fällung der SDS-Protein-Komplexe. Diese wurden abzentrifugiert (5 Minuten, 14000 Upm). Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und das Präzipitat sedimentiert (15 Minuten, 14000 Upm). Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µl TE aufgenommen.

### **5.2.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus 250 ml-Kulturen**

*(Birnboim und Doly, 1979)*

Zur Gewinnung von protein- und pyrogenfreier DNA in größeren Mengen wurden 250 ml LB-Medium/ Antibiotikum mit 100 µl einer Glycerolkultur oder 1 ml einer Vorkultur angeimpft. Nach einer Wachstumsdauer von 12-16 Stunden wurden die Bakterien sedimentiert (Beckman-Zentrifuge, JA10-Rotor, 6000 Upm). Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem „Jet Star 2.0 Maxi-Plasmid-Kit“ (GENOMED) bzw. „Qiagen Maxi Kit“ (QIAGEN). Die Plasmid-DNA wurde in 300-800 µl TE aufgenommen.

### **5.2.13 DNA-Sequenzierung**

*(Sanger et al., 1977)*

Zur Ermittlung von DNA-Sequenzen wurde die von *Sanger et al.* beschriebene Kettenabbruch-Methode verwendet. Dazu wird ein Oligonukleotid, welches zu einem bereits bekannten DNA-Abschnitt der zu sequenzierenden DNA oder zum Vektor (T3, T7) komplementär ist benötigt. Dieses Oligonukleotid kann an einzelsträngige DNA hybridisieren und dient dann als Startermolekül (Primer) für die DNA-Polymerase. In dem Reaktionsgemisch sind zur Verlängerung des „Primers“ Desoxynukleosidtriphosphate enthalten, von denen eins, z. B. dATP, radioaktiv markiert ist. Diese Elongation wird in 4 getrennten Reaktionen durch den Einbau von Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) terminiert. Ihnen fehlt die 3'-Hydroxyl-Gruppe, die zur Elongation benötigt wird. Somit entstehen unterschiedlich lange, radioaktiv markierte DNA-Fragmente, die gelelektrophoretisch getrennt und analysiert werden können.

Zur Denaturierung (erzeugt Einzelstrang-DNA) wurden 4 µg Plasmid-DNA in 36 µl Wasser mit 4 µl einer 2 M NaOH-Lösung versetzt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 4 µl 2 M NH<sub>4</sub>OAc-Lösung pH 4,5 neutralisiert. Der Ansatz wurde mit 100 µl Ethanol versetzt und die DNA für mindestens 1 Stunde bei -80 °C gefällt. Die DNA wurde pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Alle weiteren Reaktionsschritte erfolgten unter Verwendung des „T7 Sequencing™ Kit“ (PHARMACIA). Das DNA-Pellet wurde in einer Hybridisierungslösung bestehend aus 2 µl Annealing Buffer, 10 µl Wasser und 2 µl Oligonukleotidlösung (20 pmol/µl) resuspendiert, 20 Minuten bei 37 °C und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine Sequenzierlösung bestehend

aus 1 µl Wasser, 3 µl Labelling Mix dATP, 2 µl T7-DNA-Polymerase (1,5 U/µl) und 1 µl [<sup>35</sup>S]dATP (100 mCi/ml, 1000 Ci/mmol, AMERSHAM BUCHLER) angesetzt. Desweiteren wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen je 2,5 µl der Didesoxynukleosidtriphosphate enthaltenden Terminationslösungen vorbereitet. Nach Beendigung der 10 minütigen Inkubationszeit der Hybridisierungsreaktion wurden zu diesem Ansatz 6 µl der Sequenzierlösung pipettiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von diesem Ansatz wurden dann je 4,5 µl zu den auf 37 °C vorgewärmten Terminationslösungen gegeben. Nach 5 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit Stopppuffer beendet. Die Sequenzreaktionen konnten bei -20 °C für mehrere Tage gelagert werden. Vor der Auftrennung durch denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Sequenzreaktionen durch 2 minütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert.

### 5.2.14 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Sequenzierreaktionen wurden in 6 %igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen aufgetrennt. Diese Gele wurden horizontal zwischen zwei sauberen Glasplatten, von denen die Kleinere mit Dichlordimethylsilan silanisiert war, blasenfrei gegossen. Dazu wurden 60 ml Sequenziergellösung mit 500 µl 10 % APS und 40 µl TEMED (ROTH) versetzt. Die Glasplatten wurden durch 0,5 mm starke Abstandhalter getrennt. Sofort nach Gießen des Gels wurden Haifischkämme der gleichen Stärke mit der glatten Seite zum Gel eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine vertikale S2-Gelapparatur (LIFE TECHNOLOGIES) eingesetzt. Als Kathodenpuffer wurde 1 x TBE, als Anodenpuffer 3 x TBE verwendet. Die Haifischkämme wurden herausgezogen und mit den Zähnen zum Gel hin eingesetzt. Das Gel wurde bei 65 W für ca 30 bis 60 Minuten vorgewärmt. Erst dann wurden Proben aus den Sequenzierreaktionen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 65 W für 2 bis 5 Stunden. Dann wurde die kleine, silanisierte Glasplatte entfernt, das Gel auf ein Whatman 3MM-Papier (SCHLEICHER & SCHUELL) transferiert und anschließend 30 min bei 80 °C im Ölpumpenvakuum getrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde ein „Biomax™ MR“ Röntgenfilm (KODAK) aufgelegt, nach 24 Stunden entwickelt und ausgewertet.

### **5.2.15 Präparation von Transgenkonstrukten für die Oozyten-Injektion**

Nach entsprechendem Restriktionsverdau von 10 µg Transgen-Plasmid in 0,1 ml Volumen, wurde der Restriktionsansatz auf ein Agarosegel geladen und ohne Zugabe von Ethidiumbromid elektrophoretisch getrennt. Zwei kleine Seitenabschnitte in Laufrichtung wurden anschließend vom Restgel abgetrennt und mit Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die gefärbten DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell markiert und die drei Gelteile wieder zusammengefügt. Daraus ließ sich ohne DNA-Interkalation und UV-Licht-Behandlung rekonstruieren, wo bei Tageslicht die Bande des Transgenkonstruktes aus dem Gel auszuscheiden war. Die Aufreinigung aus dem Gel erfolgte wie unter 5.2.7. Ein weiterer Reinigungsschritt wurde nachgeschaltet, indem mit „Elu-Tips“ (SCHLEICHER & SCHUELL) nach Angaben des Herstellers die DNA von Salzen und feinsten Verunreinigungen befreit und in 100 µl Transgen-Puffer aufgenommen wurde. Die Abschätzung der Fragmentkonzentration erfolgte nach Agarosegel-Elektrophorese durch einen Konzentrationsmarker und Ethidiumbromidfärbung unter UV-Beleuchtung.

### **5.2.16 Präparation genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen**

(*Sambrook et al., 1989*)

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde ihnen im Alter von 4 Wochen die Schwanzspitze gekappt und diese dann in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß über Nacht bei 56 °C in 0,75 ml MMTB + 35 µl Proteinase K-Lösung proteolytisch abgebaut. Anschließend wurden die Haarreste bei 13.000 Upm 10 min abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,75 ml Isopropanol pipettiert. Die ausgefallene genomische DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 0,1 ml TE resuspendiert. Nach Konzentrationsbestimmung im Photometer bei 260 nm wurde die DNA-Lösung bei 4 °C gelagert.

### **5.2.17 Restriktionsverdau genomischer DNA**

8 µg der genomischen Schwanzspitzen-DNA wurden mit der für das jeweilige Konstrukt spezifischen Restriktionsendonuklease über Nacht inkubiert. Dabei wurden 50 U einer konzentrierten Charge Restriktionsenzym auf 40 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Wenn erforderlich

wurden nach 12 h noch einmal 50 U dazupipettiert und die Proben nach 6 weiteren Stunden Inkubationszeit anschließend auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und für 12 h bei 25 V elektrophoretisch aufgetrennt.

### **5.2.18 Transfer von DNA auf Nylonmembranen**

*(Southern, 1975)*

DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten in 0,25 M HCl-Lösung depuriniert, und dann in 0,4 M NaOH-Lösung neutralisiert (20 Minuten). Zum Transfer der DNA auf eine Nylonmembran, „Qiabranne“ (QIAGEN), wurde die Methode des Schwerkraft-Alkali-Transfers angewendet. Dazu wurde ein ca. 8 cm hoher Stapel Papiertücher auf eine Glasplatte gelegt. Darauf kam eine etwa 3 cm dicke Schicht aus Whatman 3MM Papier in der gleichen Größe wie das Agarosegel. Es folgte eine Lage aus 3 in Whatman 3MM Papieren, angefeuchtet mit 0,4 M NaOH. Darauf wurde die ebenfalls in der NaOH-Lösung angefeuchtete Nylonmembran gelegt, das vorbereitete Agarosegel wurde blasenfrei aufgelegt. Nach zwei angefeuchteten Whatman 3MM Papieren wurde eine angefeuchtete Brücke aufgelegt, deren Enden in ein Reservoir mit 0,4 M NaOH tauchten. Den Abschluß bildete eine Glasplatte, die zusätzlich mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert wurde. Der Transfer erfolgte durch Schwerkraft und Flüssigkeitsstrom für 6-12 Stunden. Anschließend wurde die Membran kurz in 2 x SSC gespült um Agarosereste zu entfernen. Durch UV-Vernetzung (Stratalinker, STRATAGENE) wurde die DNA kovalent an die Membran gebunden .

### **5.2.19 Herstellung radioaktiv markierter Sonden**

Zur Hybridisierung von Southern-Blots wurden radioaktiv markierte DNA-Fragmente benötigt. Die radioaktive Markierung erfolgte unter Verwendung des Megaprime Labelling Kits (AMERSHAM BUCHLER). Dabei dienen Zufallsnukleotide (Nonamere) als Startermolekül. Für eine durch das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) katalysierte DNA-Synthese wurde radioaktives dCTP eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung wurden 50 ng eines gereinigten DNA-Fragments in 29 µl Wasser mit 5 µl des Zufallsoligonukleotids versetzt, 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dem An-



satz wurden 10 µl 10 x Puffer (AMERSHAM BUCHLER) und 2 µl Klenow-Fragment (1 U/µl) zugegeben. Anschließend erfolgte Zugabe von 4 µl [<sup>32</sup>P]CTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, AMERSHAM BUCHLER) und eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C. Schließlich wurden nicht eingebaute, freie Nukleotide nach dem Prinzip der Gelfiltration über „Qiaquick spin columns“ (QIAGEN) abgetrennt. Die spezifische Aktivität des gereinigten, radioaktiv markierten DNA-Fragments erfolgte durch Cerencov-Zählung. Vor dem Einsatz der Sonden wurden sie für 5-10 Minuten bei 95 °C denaturiert.

#### **5.2.20 Hybridisierung an immobilisierte DNA**

Zur Hybridisierung wurde die Membran in einer Hybridisierungsröhre (SCHOTT) mit 10 ml Prähybridisierungslösung für mindestens 2 Stunden in einem Hybridisierungssofen bei 68 °C prähybridisiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch die gleiche Menge Hybridisierungslösung ersetzt, der ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid in einer Endkonzentration von  $1 \times 10^6$  cpm/ml zugesetzt wurde. Die Hybridisierung erfolgte für 6-12 Stunden bei 68 °C. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit 2 x SSC bzw. 2 x SSC/0,1 % SDS gewaschen und autoradiographisch ausgewertet.

#### **5.2.21 Polymerasekettenreaktion („PCR“)**

(Saiki *et al.*, 1985, 1988)

Zur Analyse des p53-Status transgener und K. o.-Mäuse wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet. Die Reaktion wurde in 0,1 ml Reaktionsgefäßen (EPPENDORF) durchgeführt. Der Ansatz enthielt 10 ng genomischer DNA, je 5 pmol eines 5'- und eines 3'-Oligonukleotides, 1 µl dNTP-Mix, 2 µl PCR-Puffer (AGS) in einem Volumen von 20 µl. Der Ansatz wurde mit 50 µl Mineral-Öl (SIGMA) überschichtet und in einem Personal Thermocycler (BIOMETRA) auf 94 °C erhitzt. Nach 3 Minuten bei 94 °C wurden 0,2 µl Taq-Polymerase (4 U/µl, AGS) zugegeben und ein Programm mit 30-35 Zyklen gestartet:

Denaturierung	30 Sekunden 94 °C
Oligonukleotid-Anlagerung	30 Sekunden 55 °C
Taq-Polymerase-Reaktion	45 Sekunden 72 °C (ca. 1 min/1000 bp Produkt)

Nach dem letzten Zyklus wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten bei 72 °C inkubiert. Je 10 µl eines Ansatzes wurden durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

### 5.3 Proteine

#### 5.3.1 Proteinextrakte aus Kulturzellen

Suspensionszellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen (Mikrofuge, 2000 Upm, 4 °C, 5 Minuten), und das Pellet in 50 µl Extrakt-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert (Lyse), anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch eine Zentrifugation (Mikrofuge, 14000 Upm, 4 °C, 15 Minuten) pelletiert. Vom Überstand wurde 1 µl zur Proteinbestimmung entnommen, das restliche Extrakt wurde mit gleichem Volumen 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und bei -20 °C gelagert.

#### 5.3.2 Proteinbestimmung

*(Bradford, 1976)*

Das Testprinzip dieser Methode basiert darauf, daß sich in saurer Lösung bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Protein das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm verschiebt.

Es wurde BSA in verschiedenen Konzentrationen zur Erstellung einer Standardkurve angesetzt (1-10 µg/800 µl). 1 µl aus den jeweiligen Proteinproben wurden in 800 µl H<sub>2</sub>O pipetiert. Die BSA-Standards und die verdünnten Proben wurden mit 200 µl Biorad-Farbstofflösung (BIORAD) versetzt, und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

### 5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Proteine wurden in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) elektrophoretisch in einer Mini-Proteingelapparatur (Keutz) aufgetrennt. Zuerst wurde ein 5 cm hohes 10-15 %iges Trenngel gegossen, und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Isopropanol entfernt, das 5 % Sammelgel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Min. bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte zuerst bei 15 mA (im Sammelgel) und später bei 30 mA in 1 x SDS-Laufpuffer. Als Molekulargewichtsstandard wurden „Prestained SDS-PAGE Standard - broad range“ (BIORAD) und „Biotinylierter Protein-Marker - broad range“ (NEBiolabs) eingesetzt.

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	5 %
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
Sammelgelpuffer				1,25 ml
Wasser	4,09 ml	3,25 ml	2,42 ml	2,03 ml
Rotiphoese Gel 30	3,33 ml	4,17 ml	5,00 ml	0,67 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	25 µl

**Tab. 2: Zusammensetzung der denaturierenden Proteingele**  
ausreichend für 2 Mini-Gele

### 5.3.4 Proteintransfer und immunologischer Nachweis

Zum Transfer von Proteinen auf Nylonmembranen wurde das „semi-dry“ Verfahren (Transfer-Apparatur, KEUTZ) angewandt. Dazu wurde auf der Graphitanode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgebaut: 6 Whatman 3MM-Papiere mit Anodenpuffer-1, 3 Whatman 3MM-Papiere mit Anodenpuffer-2, Hybond C Membran (AMERSHAM BUCHLER) mit Anodenpuffer-2, Proteingel, 9 Whatman 3MM-Papiere mit Kathodenpuffer angefeuchtet. Der Trans-

fer wurde 2 Stunden lang bei 1,5 mA/cm<sup>2</sup> (50 mA pro Mini-Gel) durchgeführt. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran 1 min mit Ponceau S (SERVA) angefärbt, und anschließend mit Wasser wieder entfärbt. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden mit Blotto abgesättigt (Inkubationszeit 30 min bis über Nacht). Anschließend wurde der Blot mit dem Erstantikörper, verdünnt in Blotto, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde mehrmals mit 0,1 % Tween 20/PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper (1:5000, DIANOVA) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,1 % Tween 20/PBS wurde der Blot mit dem „ECL-Kit“ (BOEHRINGER-MANNHEIM) entwickelt.

Bezeichnung	Herkunft	Beschreibung	Verdünnung
CII10	Küpper	Maus-Hybridomüberstand gegen N-Term der PARP-DNA-Bindungsdomäne	1 : 50
FI23	Küpper	Maus-Hybridomüberstand gegen C-Term der hPARP-DNA-Bindungsdomäne	1 : 20
pAB240	Deppert	Maus-Hybridomüberstand gegen p53	1 : 50
p19	Santa Cruz	Gereinigtes Kaninchenserum gegen p21 Bax-	1 : 2000

**Tab. 3: Erst-Antikörper für Immunoblot**

sekundäre Antikörper:

Esel-anti-Kaninchen-IgG	Peroxidase-gekoppelt	DIANOVA
Esel-anti-Maus-IgG	Peroxidase-gekoppelt	DIANOVA

## **5.4 Zellkultur**

### **5.4.1 Kultivierung von Zelllinien**

Die verwendeten EL4-Zellen sind eine CD4 einzelpositive Thymomzelllinie der Maus. Sie wurden in Suspension mit RPMI 1640, 10 % FBS, Penicillin/Streptomycin, (Glutamin) in speziellen Brutschränken bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmo-

sphäre kultiviert. Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Geräte und Lösungen waren vor Benutzung sterilisiert worden.

### 5.4.2 Passagieren von Zelllinien

Die EL4-Zellsuspension wurde auf eine Zelldichte von  $10^5$ /ml eingestellt und nach 3-4 Tagen bei 1000 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert, die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und wieder auf eine Dichte von  $10^5$  Zellen/ml eingestellt.

### 5.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfriermedium enthält 10 % DMSO. Die Zellen sollten sich daher vor dem Einfrieren bzw. nach dem Auftauen so kurz wie möglich in diesem Medium befinden. Die Zellen einer 200 ml Zellkultur-Flasche wurden bei 1000 Upm pelletiert und in 3 ml Einfriermedium-A aufgenommen. Anschließend wurde das gleiche Volumen Einfriermedium-B langsam zugegeben. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach einem Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff in Trockeneis überführt, und dann im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt, bis die Zellsuspension gerade aufgetaut war. Die Zellen wurden in Kulturmedium überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und in einer 50 ml Flasche ausgesät.

### 5.4.4 Elektroporation

Für die Elektroporation der EL4 Maus-T-Zelllinie wurde die Zellsuspension 24 h vor der Transfektion auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Nach Abzentrifugieren bei 1000 Upm wurden die Zellen einmal in frischem RPMI-Medium gewaschen, gezählt und zu einer Endkonzentration von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml in Medium resuspendiert. Pro Elektroporation wurden  $1 \times 10^7$  Zellen und insgesamt 10-15 µg pyrogenfreier Plasmid-DNA in 0,2 ml RPMI in eine sterile Kondensator-Küvette pipettiert und dann wenige Minuten auf Eis gekühlt. Die Elektroporation wurde

bei 950  $\mu$ F und 200 V durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden 1 ml Kulturmedium zugegeben und die Zellen vorsichtig in eine 6 cm Gewebekulturschale (NUNC) überführt. Nach 14 Stunden (je nach Experiment) wurden die Zellen mit 50  $\mu$ M Etoposid behandelt oder mit 2 Gy  $\gamma$ -bestrahlt und anschließend innerhalb von 2 bis 6 Stunden für den Reportergentest geerntet.

#### **5.4.5 Messung der Reportergenaktivität (Luziferase)**

Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen, in 100  $\mu$ l Lysispuffer aufgenommen, 5 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 14.000 Upm in einer gekühlten Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Luziferaseaktivität verwendet. Dazu wurde ein Luminometer (BERTHOLD) benutzt. 10  $\mu$ l des Überstandes wurden in einem geeigneten Polycarbonatröhrchen (SARSTEDT) vorgelegt. Vom Luminometer wurden 100  $\mu$ l Luziferinlösung injiziert. Die relativen Lichteinheiten (RLU) wurden in einer Meßzeit von 10 Sekunden integriert.

#### **5.4.6 Herstellen einer Einzelzellsuspension**

Den Mäusen wurden die entsprechenden Organe mit primären T-Zellen wie Thymus, Milz und intestinale Lymphknoten entnommen und zwischen zwei geschliffenen Objektträgern in kaltem PBS/5 % FCS zerrieben. Zur Abtrennung von Bindegewebsresten wurden die Zellen durch Gaze filtriert und mit 2 ml FCS unterschichtet. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 1000 Upm wurden sie wieder in kaltem PBS/5 % FCS aufgenommen und die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### **5.4.7 Röntgenbestrahlung von Einzelzellsuspensionen**

Die Bestrahlung der Einzelzellsuspensionen erfolgte auf Eis mit der Röntgenanlage Stabilipan (SIEMENS) unter Dosimeter-Kontrolle (PTW-SN 4). Bestrahlt wurde bei 15 mA, 240 kV, 0,5 mm Kupfer-Filter mit einer Dosisleistung von 1 Gy/min. Nach 2 min Bestrahlungszeit wurden die Proben zur weiteren Inkubation bei 37 °C im Brutschrank gehalten.

### 5.4.8 Durchflusszytometrie

Alle Analysen wurden mit dem FACScan Calibur, der CELLQUEST-Software und den entsprechenden Puffern von BECTON DICKINSON durchgeführt.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellpopulationen aufgrund ihrer Morphologie, der Expression von Oberflächen- und zellinternen Molekülen über Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper analysiert und sortiert werden. Für die FACS-Analyse wurden Einzelzellsuspensionen von  $1 \times 10^6$  T-Zellen in 0,2 ml FACS-Puffer mit jeweils 4 µl der Fluorochrom (FITC, PE, TriColor)-gekoppelten Antikörper für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Proben wurden mit Cellwash gewaschen, in 0,5 ml Cellwash resuspendiert und die verschiedenen Zellpopulationen im FACS qualitativ und quantitativ analysiert.

Zur Darstellung der verschiedenen Zellzyklusphasen und der Apoptose während der DNA-Degradation wurden die Einzelzellsuspensionen zu je  $1 \times 10^6$  Zellen in 0,3 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurde 0,9 ml  $-20^\circ\text{C}$  kalter 100 %iger Ethanol zugetropft und die Zellen über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  fixiert. Zur Analyse wurden die Proben wieder in 1 ml PBS aufgenommen, mit einer 1:50 verdünnten Propidiumiodid/RnaseA-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend direkt im FACS-Gerät vermessen und ausgewertet.

Bezeichnung	Markierung	Subtyp
CD4	FITC, PE, TriColor	Rat IgG2a
CD8a	FITC, PE, TriColor	Rat IgG2a
CD25 (Il-2Ra)	PE	Rat IgG1
CD44	FITC	Rat IgG2b
CD45R (B220)	FITC	Rat IgG2a
CD90 (Thy1.2)	PE	Mouse IgG2b

Tab. 4: Maus-Antikörper (Medac, Pharmingen) für Durchflusszytometrie

### 5.4.9 T-Zellaktivierung und $^3\text{H}$ -Thymidineinbau

96er-Mikrotiterplatten (NUNC) wurden mit 20 µl einer  $10\ \mu\text{M}$  ConA-Lösung bzw.  $5\ \text{ng}/\mu\text{l}$  Verdünnung des Maus spezifischen  $\alpha\text{-CD3}$  Antikörpers 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank vorin-

kubiert, um eine zweidimensionale Beschichtung am Boden der Mikrotiterplatte zu erreichen. Für unstimulierte Kontrollen wurden die Vertiefungen mit PBS vorinkubiert.

$1 \times 10^5$  Zellen einer Einzelzellsuspension aus der Milz einer Maus wurden pro Vertiefung in 180  $\mu$ l RPMI/10 % FCS mit Zusätzen wie 1 % Glutamin-Lösung, 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 % nicht-essentielle Aminosäure-Lösung, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung in Kultur genommen. In jedes einzelne wurde 10  $\mu$ l des  $^3$ H-Thymidin markierten RPMI-Mediums zupipettiert und bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Eine Zeitkinetik über 72 Stunden mit Messpunkten nach jeweils 24 h erforderte pro Messpunkt eine Mikrotiterplatte. Für die spätere Statistik wurden 3 Löcher mit den gleichen Bedingungen zu einem Mittelwert zusammengezogen.

Die Proben wurden zu den jeweiligen Messzeiten aus dem Brutschrank genommen und über eine Saugapparatur (EDWARDS) auf Whatman-Papier geblottet. Die einzelnen Proben wurden dabei auf abgegrenzte Quadrate des Papiers gesaugt. Eingeschweißt in Folie mit 10 ml einer Szintillationslösung wurden die Proben am Szintillationszähler (PHARMACIA) vermessen.

#### **5.4.10 DNA-Fragmentierungsanalyse**

Aus Mäusen präparierte Thymozyten in Einzelzellsuspension wurden für 20 min mit 40  $\mu$ M MNNG oder 2 min mit 2 Gy  $\gamma$ -Strahlung behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 8 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen geerntet. Je  $2 \times 10^7$  Zellen wurden bei 1000 Upm sedimentiert und mit 0,75 ml MMTB-Puffer und 35  $\mu$ l Proteinase K-Lösung für 3 h bei 56 °C lysiert. Nach einmaliger Phenol/Chloroform-Extraktion (1:1 Vol) wurde die von Proteinen getrennte DNA mit 3 Vol 100 % Ethanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 200  $\mu$ l TE resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Gleiche DNA-Mengen wurden in einem 1 %igen TAE-Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt und durch Färbung in Ethidiumbromid-Lösung unter einer UV-Lampe (302 nm) sichtbar gemacht.

#### **5.4.11 Beschichtung von Deckgläsern**

Die verwendete Zelllinie (EL4) wie auch primäre T-Zellen sind Suspensionszellen und mussten für die Poly(ADP-Ribose)-Analyse auf beschichteten Deckgläsern (22 x 22 mm<sup>2</sup>, MEN-



ZEL) sedimentiert werden. Dazu wurde eine 20 %ige Poly-Lysin-Lösung (SIGMA) angesetzt und auf die Deckgläser aufgetropft. Nach 30 Minuten wurde die Lösung abgesaugt. Die Deckgläser wurden steril bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### **5.4.12 *In situ*-Immunfluoreszenz**

Zum Nachweis der Poly(ADP-Ribose) im Zellkern von Thymozyten nach genotoxischem Stress wurden  $1 \times 10^5$  Zellen aus einer Einzelzellsuspension in 0,5 ml RPMI/10 % FCS auf 20 % Poly-Lysin (SIGMA) beschichtete Deckgläser getropft und 30 min im Brutschrank inkubiert, damit sie sich absetzen. Anschließend wurden die Deckgläser in PBS gewaschen und für 20 min in 50  $\mu$ M MNNG (SIGMA)/PBS frisch versetzt mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige MNNG in 1 N NaOH neutralisiert und die Deckgläser mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 20 min mit eiskalter 10 % Trichloressigsäure/PBS dehydriert und anschließend 10 min bei –20 °C in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 70 % bis 100 % fixiert. Nach Lufttrocknung wurden die Zellen in PBS rehydriert und für 1 h mit 50  $\mu$ l des Anti-Poly(ADP-Ribose)-Antikörper 10H (*Kawamitsu et al.*, 1984) im Brutschrank inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min mit 50  $\mu$ l einer 1:200 Verdünnung des Cy2-gekoppelten Zweitantikörpers (anti-Maus-IgG, PHARMINGEN) im Brutschrank inkubiert. Die Deckgläser wurden mit PBS gewaschen, kurz in  $\text{H}_2\text{O}$  getaucht und dann abgetropft. Nach Auftragen eines Tropfen Aquamounts (SIGMA) auf Objektträger wurden die Deckgläser (Zellen nach unten) luftblasenfrei aufgesetzt und die Proben mit einem Fluoreszenzmikroskop (ZEISS) ausgewertet bzw. auf Dia-Film belichtet.

#### **5.4.13 „Comet Assay“**

##### **5.4.13.1 *Mikrogelelektrophorese***

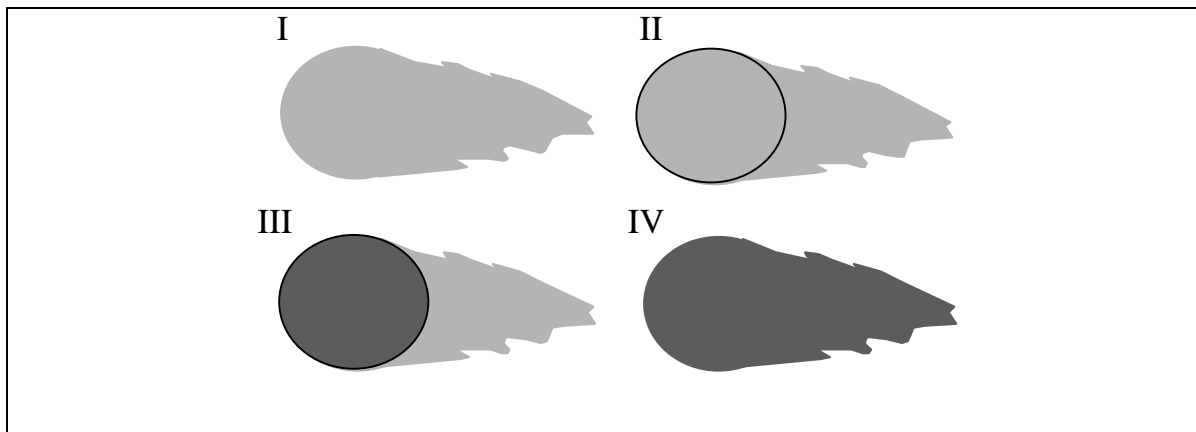
Auf der Basis von Östling und Johanson 1984 zuerst beschriebenen Technik wurden weitere Optimierungen zur Standardisierung des „Comet Assay“ oder „Single Cell Gel Electrophoresis Assay“ durchgeführt. Mit dieser Mikrogel-Elektrophorese-Methode kann man individuell für jede Zelle den Grad der DNA-Schädigung bestimmen. Bei diesem Verfahren wird nicht jeder Strangbruch direkt bestimmt, sondern die Integrität des Chromatins indirekt aber quan-

titativ gemessen. Abhängig vom primären Schaden kann man die Reparaturkapazität einer Zellpopulation zeitabhängig bestimmen.

0,1 ml einer Zellsuspension mit  $5 \times 10^4$  Zellen wurden sofort nach der Bestrahlung oder MNNG-Behandlung auf Eis gehalten, um Reparaturvorgänge zu verhindern. Die Suspension wurde in 0,5 ml einer 0,75 %igen Low-melt-Agaroselösung aufgenommen, auf einem mit 0,1 %igen Agarose vorbeschichteten Standardobjektträger ( $76 \times 26 \text{ mm}^2$ , MENZEL) aufgetragen und sofort auf eine  $4^\circ\text{C}$  Kälteplatte gelegt. Die Einhaltung der Temperaturkonstanz wurde durch Kühlpumpensysteme gewährleistet. Nach ausreichender Gelierung (ca. 10 min) wurden die Gele bei  $20^\circ\text{C}$  für 15 min in einer 2,5 %igen SDS-Lösung inkubiert und die Zellen dabei lysiert. Die Objektträger wurden bei  $20^\circ\text{C}$  für 5 min in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend in eine modifizierte Flachbett-Elektrophoresekammer (FBE-3000, PHARMACIA) mit 200 ml TBE-Puffer pH 8,4 eingespannt. Die Elektrophorese erfolgte bei  $10^\circ\text{C}$  für 5 min mit einem schwachen elektrischen Feld von 2,5 V/cm. Das heißt bei einem standardisierten 6 cm-Elektrodenabstand und 15 V hatte der Strom eine Stärke von 15-18 mA. Die Präparate wurden anschließend für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und 30 min bei  $45^\circ\text{C}$  luftgetrocknet. Bei  $-20^\circ\text{C}$  waren die Proben monatelang haltbar.

#### **5.4.13.2 Kometen-Messung**

Die Anfärbung der Präparate machte eine sofortige Verarbeitung erforderlich. Die tiefgefrorenen Gele wurden aufgetaut und 15 min in  $\text{H}_2\text{O}$  rehydratisiert. 0,2 ml einer Propidiumiodid-Lösung pH 7,5 (ca.  $2 \mu\text{g}$  pro Objektträger) wurden auf das Gel aufgetragen und mit Deckgläsern bedeckt. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln konnten die Kometen mit einem Fluoreszenzmikroskop (MPV II, LEITZ) ausgewertet werden. Die Anregung erfolgte mit einem Grünlicht-Filter (530-560 nm), und die Detektion der emittierten roten ( $> 580 \text{ nm}$ ) Fluoreszenzsignale mit einer CCD-Videokamera (PROXITRONIC). Ein geeignetes Computerprogramm (Böcker *et al.*, 1997) gewährleistete die Visualisierung der Meßdaten. Mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung wurden Gesamt-DNA-Gehalt, Fluoreszenz-Intensität im Kopf- und Schweifbereich und Gesamtfläche des Einzelkometen bestimmt. Die Meßempfindlichkeit und die Größe des Kopfradius konnten den Erfordernissen der jeweiligen Meßsituation – abhängig von der Fluoreszenzintensität – angepasst werden.



**Abb. 22: Schematische Darstellung des Messprinzips von „Kometen“**

Nach Fokussierung des Kometen {I} wurde der Kopfbereich markiert {II}. Die Kopffluoreszenz {III} und anschließend ebenso die Gesamtfluoreszenz {IV} wurden digital gemessen.

## 6 LITERATUR

Adamietz P. & Rudolf A. (1984): ADP-ribosylation of nuclear proteins *in vivo*. Identification of H2B as a major acceptor for mono- and poly(ADP-ribose) in dimethylsulfate treated hepatome AH 7974 cells.

*J.Biol.Chem.* 259: 6841-6846

Adamietz P. (1987): Poly(ADP-Ribose) synthetase is the major endogenous nonhistone acceptor for poly(ADP-Ribose) in alkylated rat hepatoma cells.

*Eur.J.Biochem.* 169:365-372

Adams J. M. & Cory S. (1998): The Bcl-2 protein family: arbiter of cell survival.

*Science* 281: 1322-1326

Agarwal M. L., Agarwal A., Taylor W. R., Wang Z.-Q., Wagner E. F., Stark G. R. (1997): Defective induction but normal activation and function of p53 in mouse cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase.

*Oncogene* 15: 1035-1041

Althaus F. R. & Richter C. (1987): ADP-ribosylation of proteins: Enzymology and biological significance.

*Springer-Verlag, Berlin*

Althaus F. R. (1992): Poly(ADP-ribosyl)ation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair.

*J.Cell Sci.* 102:663-670

Althaus F. R., Höfferer L., Kleczkowska H. E., Malanga M., Naegeli H., Panzeter P. L., Realini C. A. (1994): Histone shutteling by ADP-ribosylation

*Mol. Cell. Biochem.* 138: 53-59

Althaus F. R., Kleczkowska H. E., Malanga M., Muntener C. R., Pleschke J. M., Ebner M., Auer B. (1999): Poly(ADP-ribosyl)ation: a DNA break signal mechanism.

*Mol. Cell Biochem.* 193: 5-11

Alvarez-Gonzalez R. (1988): 3'-Deoxy-NAD<sup>+</sup> as substrate for poly(ADP-ribose) polymerase and the reaction mechanism of poly(ADP-ribose) elongation.

*J. Biol. Chem.* 263: 17690-17696

Alvarez-Gonzalez R., Eichenberger R., Althaus F. R. (1986): Poly(ADP-ribose) biosynthesis and suicidal NAD<sup>+</sup> depletion following carcinogen exposure of mammalian cells.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 1051-1057

Amé J.-C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. (1999): PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase.

*J. Biol. Chem.* 274: 17860-17868

Ashkenazi A. & Dixit V. M. (1998): Death receptors: signaling and modulation.

*Science* 281: 1305-1308

Babiychuk E., Cottril P. B., Storozhenko S., Fuangthong M., Chen Y., O'Farrel M. K., van Montagu M., Inze D., Kushnir S. (1998): Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerase.

*Plant J.* 15: 635-645

Baker S. J., Fearon E. R., Nigro J. M., Hamilton S. R., Preisinger A. C., Jessup J. M., van Tuinen P., Ledbetter D. H., Barker D. F., Nakamura Y., White R., Vogelstein B. (1989): Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas.

*Science* 244: 217-221

Banin S., Moyal L., Shieh S., Taya Y., Anderson C. W., Chessa L., Smorodinsky N. I., Prives C., Reiss Y., Shiloh Y., Ziv Y. (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage.

*Science* 281: 1674-1677

Baroja M. L., Lorre K., Van Vaeck F., Ceuppens J. L. (1989): The anti-T cell monoclonal antibody 9.3 (anti-CD28) provides a helper signal and bypasses the need for accessory cells in

T cell activation with immobilized anti-CD3 and mitogens.

*Cell Immunol.* 120: 205-217

Beneke S., Meyer R., Bürkle A. (1997): Isolation of cDNA encoding full-length rat (*Rattus norvegicus*) poly(ADP-ribose) polymerase.

*Biochem. Mol. Biol. Int.* 43: 755-761

Berger N. A., Berger S. J., Gerson S. L. (1987): DNA repair, ADP-ribosylation and pyridine nucleotide metabolism as targets for cancer chemotherapy.

*Anticancer Drug Des.* 2:203-209

Berger N. A. (1985): Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA-damage.

*Radiat. Res.* 101: 4-15

Bernardi R., Negri C., Donzelli C., Guano F., Torti M., Prosperi M., Scovassi A. I. (1995): Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in apoptotic human cells.

*Biochimie* 77: 378-384

Birnboim H. C. & Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

*Nucl. Acid Res.* 7: 1513-1523

Blattner C., Tobiasch E., Litfen M., Rahmsdorf H. J., Herrlich P. (1999): DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation.

*Oncogene* 18: 1723-1732

Böcker W., Bauch T., Müller W.-U., Streffer C. (1997): Image analysis of comet assay measurements.

*Int. J. Radiat. Biol.* 72: 449-460

Bogue M. A., Zhu C., Aguilar-Cordova E., Donehower L. A., Roth D. B. (1996): p53 is required for both radiation-induced differentiation and rescue of V(D)J rearrangement in scid mouse thymocytes.

*Genes Dev.* 10: 553-565

Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding.

*Anal. Biochem.* 72: 248-254

Brady H. J., Salomons G. S., Bobeldijk R. C., Berns A. J. (1996): T cells from baxalpha transgenic mice show accelerated apoptosis in response to stimuli but do not show restored DNA damage-induced cell death in the absence of p53 gene product.

*EMBO J.* 15: 1221-1230

Braun S. A., Panzeter P. L., Collinge M. A., Althaus F. R. (1994): Endoglycosidic cleavage of branched polymers by poly(ADP-ribose) glycohydrolase.

*Eur. J. Biochem.* 220: 369-375

Burkart V., Wang Z.-Q., Radons J., Heller B., Herceg Z., Stingl L., Wagner E. F., Kolb H. (1999): Mice lacking the poly(ADP-Ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin.

*Nat. Med.* 5: 314-319

Bürkle A., Meyer T., Hilz H., zur Hausen H. (1987): Enhancement of N-methyl-N'-nitrosoguanidine-induced DNA amplification in a Simian virus 40-transformed Chinese hamster cell line by 3-aminobenzamid.

*Cancer Res.* 47: 3632-3636

Caelles C., Helmberg A., Karin M. (1994): p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes.

*Nature* 370: 220-223

Canman C. E., Lim D. S., Cimprich K. A., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M. B., Siliciano J. D. (1998): Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53.

*Science* 281: 1677-1679

Chambon P., Weill J. D., Doly J., Strosser M. T., Mandel P. (1966): On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of rat liver nuclei.

Biochem Biophys. Res. Commun. 25: 638-643

Chen Y.-M., Shall S., O'Farrell M. (1994): Poly(ADP-ribose) polymerase in plant nuclei.

*Eur. J. Biochem.* 224: 135-142

Cherney B., McBride O. W., Chen D., Alkhatib H., Bhatia K., Hensley P., Smulson M. E.

(1987): cDNA sequence, protein structure, and chromosomal location of the human gene for poly(ADP-ribose) polymerase.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8370-8373.

Clarke A. R., Purdie C. a., Harrison D. J., Morris R. G., Bird C. C., Hooper M. L., Wyllie A.

H. (1993): Thymocytes apoptosis induced by p53 dependent and independent pathways.

*Nature* 362: 849-852

Cloutier J. F. & Castonguay A. (1998): Modulation of DNA repair by various inhibitors of

DNA synthesis following 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NKK) induced DNA damage.

*Chem. Biol. Interact.* 110: 7-25

Cobianchi F. & Wilson S. H. (1987): Enzymes for modifying and labeling DNA and RNA.

*Methods Enzymol.* 152: 94-110

Coll J. M., Hickey R. J., Cronkey E. A., Jiang H.-Y., Schaper L., Lee M. Y., Uitto L., Syvaaja

J. E., Malkas L. H. (1997): Mapping specific protei-protein interactions within the core component of the breast cell DNA synthesome.

*Onc. Res.* 9: 629-639

Cory S. J. & Adams J. M. (1988): Transgenic mice and oncogenesis.

*Annu. Rev. Immunol.* 6: 25-48

Creissen D. & Shall S. (1982): Regulation of DNA ligase activity by poly(ADP-ribose).

*Nature* 296: 271-272



Dantzer F., Nasheuer H-P., Vonesch J-L., de Murcia G., Menissier-de Murcia J. (1998): Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase  $\beta$ -primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication.

*Nuc. Acid Res.* 26: 1891-1898

Dantzer F., Schreiber V., Niedergang C., Trucco C., Flatter E., De La Rubia G., Oliver J., Rolli V., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. (1999): Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair.

*Biochimie* 81: 69-75

Darby M. K., Schmitt B., Jongstra-Bilen J., Vosberg H. P. (1985): Inhibition of calf thymus type II DNA topoisomerase by poly(ADP-ribosyl)ation.

*EMBO J.* 4: 2129-2134

De Capoa A., Febbo F. R., Giovannelli F., Niveleau A., Zardo G., Marenzi S., Caiafa P. (1999): Reduced levels of poly(ADP-ribosyl)ation result in chromatin compaction and hypermethylation as shown by cell-by-cell computer-assisted quantitative analysis.

*FASEB J.* 13: 89-93

de Murcia J. M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F. J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Waltzinger C., Chambon P., de Murcia G. (1997): Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7303-7307

de-Murcia G., Huletsky A., Lamarre D., Gaudreaus A., Pouyet J., Daune M., Poirier G. G. (1986): Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation.

*J. Biol. Chem.* 261: 7011-7017

di Fagagna F., Hande M. P., Tong W.-M., Lansdorp P. M., Wang Z.-Q., Jackson S. P. (1999): Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability.

*Nat. Gen.* 23: 76-80

Ding R., Pommier Y., Kang V. H., Smulson M. (1992): Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining. *J. Biol. Chem.* 267: 12804-12812

Donehower L. A., Harvey M., Slagle B. L., McArthur M. J., Montgomery C. A., Butel J. S., Bradley A. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-221

Durkacz B. W., Omidiji O., Gray D. A., Shall S. (1980): (ADP-ribose)<sub>n</sub> participates in DNA excision repair. *Nature* 283: 593-596

Eki T. & Hurwitz J. (1991): Influence of poly(ADP-ribose) polymerase on the enzymatic synthesis of SV40 DNA. *J. Biol. Chem.* 266: 3087-3100

Eki T. (1994): Poly(ADP-ribose) polymerase inhibits DNA replication by human replicative DNA polymerase  $\delta$ , and *in vitro*. *FEBS Letters* 356:261-266

Eliasson M. J. L., Sampei K., Mandir A. S., Hurn P. D., Traystman R. J., Bao J., Pieper A., Wang Z.-Q., Dawson T. M., Snyder S. H., Dawson V. L. (1997): Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Medicine* 3: 1089-1095

Endres M., Wang Z.-Q., Namura S., Waeber C., Moskowitz M. A. (1997): Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17: 1143-1151

Evan G. & Littlewood T. (1998): A matter of life and cell death. *Science* 281: 1317-1322

Ferro A. M. & Olivera B. M. (1982): Poly(ADP-ribosyl)ation *in vitro*. Reaction parameters and enzyme mechanism.

*J. Biol. Chem.* 257: 7808-7813

Ferro A. M., Higgins N. P., Olivera B. M. (1983): Poly(ADP-ribosyl)ation of a DNA topoisomerase.

*J. Biol. Chem.* 258: 6000-6003

Fritsch M., Haessler C., Brandner G. (1993): Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents.

*Oncogene* 8: 307-318

Fukasawa K., Choi T., Kuriyama R., Rulong S., Vande Woude G. F. (1996): Abnormal centrosome amplification in the absence of p53.

*Science* 271: 1744-1747

Giner H., Simonin F., de Murcia G., Meissier-de Murcia J. (1992): Overproduction and large-scale purification of the human poly(ADP-ribose) polymerase using a baculovirus expression system.

*Gene* 114: 279-283

Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A., Ruddle F. H. (1980): Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380-7384

Gradwohl G., Menissier-de Murcia J., Molinete M., Simonin F., Koken M., Hoeijmakers J. H.J., de Murcia G. (1990): The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single stranded breaks in DNA

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2990-2994

Green D. R. & Reed J. C. (1998): Mitochondria and apoptosis.

*Science* 281: 1309-1312

Guidos C. J., Williams C. J., Grandal I., Knowles G., Huang M. T., Danska J. S. (1996): V(D)J recombination activates p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors.

*Genes & Dev. 10: 2038-2054*

Han J., Sabbatini P., Perez D., Rao L., Modha D., White E. (1996): The E1B 19 K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible death-promoting Bax protein.

*Genes & Dev. 10: 461-477*

Hanahan D. (1989): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.

*J. Mol Biol. 166:557*

Hansen R. & Oren M. (1997): p53; from inductive signal to cellular effect.

*Curr. Op. Gen. & Dev. 7:46-51*

Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Vousden K. H., Oren M. (1995): Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53.

*Genes & Dev. 9: 2170-2183*

Heller B., Wang Z.-Q., Wagner E. F., Radons J., Bürkle A., Fehsel K., Burkart V., Kolb H. (1995): Inactivation of poly(ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells.

*J. Biol. Chem. 270: 11176-11180*

Ho Y. S., Lee H. M., Chang C. R., Lin J. K. (1999): Induction of Bax protein and degradation of lamin A during p53-dependent apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cell lines.

*Biochem. Pharmacol. 57: 143-154*

Hockenberry D., Nunez G., Milliman C., Schreiber R. D., Korsmeyer S. (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.

*Nature 348: 334-336*

Hogan B., Beddington R., Constantini F., Lacy E. (1994): Manipulating the mouse embryo.  
*CSH-Laboratory Press.*

Hunter T. (1997): Oncoprotein Networks.  
*Cell* 88: 333-346

Huppi K., Bhatia K., Siwarski D., Klinman D., Cherney B., Smulson M. (1989): Sequence and organisation of the mouse poly(ADP-ribose) polymerase gene.  
*Nuc. Acid Res.* 17: 3387-3401

Hyo C. H. & Snyder S. (1999): Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion.  
*PNAS* 96: 13978-13982

Ikejima M., Noguchi S., Yamadhita R., Ogura T., Sugimura T., Gill D. M. Miwa M. (1990): The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and the consequent enzyme activation.  
*J. Biol. Chem.* 35: 21907-21913

Jacobson M. D., Weil M., Raff M. C. (1997): Programmed cell death in animal development.  
*Cell* 88: 347-354

Jeggo P. A. (1998): PARP- another guardian angel?  
*Curr. Biol.* 8: R49-R51

Kaufmann S. H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N. E., Poirier G. G. (1993): Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.  
*Cancer Res.* 53: 3976-3985

Kannan P., Yu Y., Wankhade S., Tainsky M. A. (1999): Poly(ADP-ribose) polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation.  
*Nucl. Acids Res.* 27: 866-874

Kawaichi M., Ueda K., Hayaishi O. (1981): Multiple autopoly(ADP-ribosyl)ation of rat liver poly(ADP-ribose) synthetase. Mode of modification and properties of automodified synthetase

*J. Biol. Chem.* 256: 9483-9489

Kawamitsu H. (1984): Monoclonal antibodies to poly(ADP-ribose) recognize different structures.

*Biochem.* 23: 3771-3777

Kitada S., Krajewski S., Miyashita T., Krajewska M., Reed J. C. (1993): -Radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells *in vivo*.

*Oncogene* 12: 187-192

Küpper J.-H., de Murcia G., Bürkle A. (1990): Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation by overexpressing the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain in mammalian cells.

*J. Biol. Chem.* 265: 18721-18724

Küpper J.-H., Müller M., Jacobson M. K., Tatsumi, Miyajima J., Coyle D. L., Jacobson E. L., Bürkle A. (1995): Trans-dominant inhibition of poly(ADP-Ribosyl)ation sensitizes cells against -irradiation and N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine but does not limit DNA replication of polyomavirus replicon.

*Mol. Cell. Biol.* 15: 3154-3163

Küpper J.-H., Müller M., Bürkle A. (1996): Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation potentiates carcinogen-induced gene amplification in SV40-transformed chinese hamster cells.

*Cancer Res.* 56: 2715-2717

Kumari S. R., Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Gonzalez R. (1998): Functional interactions of p53 with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) during apoptosis following DNA-damage: Covalent poly(ADP-ribosyl)ation of p53 by exogenous PARP and noncovalent binding of p53 to its Mr 85,000 proteolytic fragment.

*Cancer Res.* 58: 5075-5078

Laemmli (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

*Nature* 227: 680-682

Lazebnik Y. A., Kaufmann S. H., Desnoyers S., Poirier G. G., Earnshaw W. C. (1994): Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE.

*Nature* 371: 346-347

Le Rhun Y., Kirkland J. B., Sha G. M. (1998): Cellular responses to DNA damage in the absence of poly(ADP-ribose) polymerase.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 1-10

LeCam E., Fack F., Menissier-de Murcia J., Cognet J. A. H., Barbin A., Sarantoglou V., Revat B., Delain E., de Murcia G. (1994): Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase.

*J. Mol. Biol.* 235: 1062-1071

Lindahl T., Satoh M. S., Poirier G. G., Klungland A. (1995): Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks.

*Trends Biochem. Sci.* 20: 405-411

Liu X., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1997): DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.

*Cell* 89: 175-184

Love S., Barber R., Wilcock G. K. (1999a): Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease.

*Brain* 122: 247-253

Love S., Barber R., Wilcock G. K. (1999b): Neuronal accumulation of poly(ADP-ribose) after brain ischaemia.

*Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25: 98-103

Lowe S. W., Schmitt E. M., Smith S. W., Osborne B. A., Jacks T. (1993): p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes.

*Nature* 362: 847-849

Ludwig A., Behnke B., Holtlund J., Hilz H (1988): Immunoquantitation and size determination of intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase from acid precipitates. An analysis of the *in vivo* status in mammalian species and lower eucaryotes.

*J. Biol. Chem.* 263: 6993-6999

Malanga M., Pleschke J. M., Kleczkowska H. E., Althaus F. R. (1998): Poly (ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions.

*J. Biol. Chem.* 273: 11839-11843

Marin M. C., Hsu B., Meyn R. E., Donehower L. A., el-Naggar A. K., McDonnell T. J. (1994): Evidence that p53 and bcl-2 are regulators of a common cell death pathway important for *in vivo* lymphomagenesis.

*Oncogene* 9: 3107-3112

Marshall (1991): Tumor suppressor genes.

*Cell* 64: 313-326

Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. (1998): XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage.

*Mol. Cell. Biol.* 18: 3563-3571

Masutani M., Suzuki K., Kamada N., Watanabe M., Ueda O., Nozaki T., Jishage K., Watanabe T., Sugimoto T., Nakagama H., Ochiya T., Sugimura T. (1999): Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2301-2304

Mendoza-Alvarez H. & Alvarez-Gonzalez R. (1993): Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular.

*J. Biol. Chem.* 268: 22575-22580



Ménissier de-Murcia J., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F. J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Waltzinger C., Chambon P., de Murcia G. (1997): Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7303-7307*

Merry D. E., Veis D. J., Hickey W. F., Korsmeyer S. J. (1994): Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS.

*Development 120: 301-311*

Meyer R., Müller M., Beneke S., Küpper J.-H., Bürkle A. (1999): Poly(ADP-ribose) polymerase: a negative regulator of alkylation-induced sister-chromatid exchanges.

*Cancer Res.: accepted*

Miyamoto T., Kakizawa T., Hashizume K. (1999): Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase.

*Mol. Cell Biol. 19: 2644-2649*

Miyashita T. & Reed J. C. (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.

*Cell 80: 293-299*

Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H. G., Lin H. K., Liebermann D. A., Hoffmann B., Reed J. C. (1994): Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*.

*Oncogene 6: 1799-1805*

Molinete M., Vermeulen W., Bürkle A., Menissier-de Murcia J., Küpper J.-H., Hoeijmakers J. H. J., de Murcia G. (1993): Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells.

*EMBO J. 12: 2109-2117*

Morrison C., Smith C. M., Stingl L., Jackson S., Wagner E. F., Wang Z.-Q. (1997): Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis.  
*Nat. Gen.* 17: 479-482

Müller W.-U., Bauch T., Streffer C., Niedereichholz F., Böcker W. (1994): Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines.  
*Int. J. Radiat. Biol.* 65: 315-319

Nacht M., Strasser A., Chan Y. R., Harris A. W., Schlissel M., Bronson R. T., Jacks T. (1996): Mutations in the p53 and SCID genes cooperate in tumorigenesis.  
*Genes & Dev.* 10: 2055-2066

Naegli H. & Althaus F. R. (1991): Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase. Histone-specific adaptations of reaction products.  
*J. Biol. Chem.* 266: 10596-10601

Naegli H., Loetscher P., Althaus F. R. (1989): Poly(ADP-ribosyl)ation of proteins. Processivity of a post-translational modification.  
*J. Biol. Chem.* 264: 14382-14385

Negri C., Donzelli M., Bernardi R., Rossi L., Bürkle A., Scovassi A. I. (1997): Multiparametric staining to identify apoptotic human cells.  
*Exp. Cell Res.* 234: 174-177

Nosseri C., Coppola S., Ghibelli L. (1994): Possible involvement of poly(ADP-ribosyl) polymerase in triggering stress-induced apoptosis.  
*Exp. Cell Res.* 212: 367-373

Oei S. L., Griesenbeck J., Schweiger M., Babich V., Kryptov A., Tomilin N. (1997a): Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribose) polymerase.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 108-111

Oei S. L., Greisenbeck J., Ziegler M., Schweiger M. (1997b): A novel function of poly(ADP-ribose)ylation: Silencing of RNA polymerase II-dependent transcription.

*Biochemistry* 37: 1465-1469

Ogata N., Ueda K., Kawaichi M., Hayaishi O. (1981): Poly(ADP-ribose) synthetase, a main acceptor of poly(ADP-ribose) in isolated nuclei.

*J. Biol. Chem.* 256: 4135-5137

Ohashi Y., Ueda K., Kawaichi M., Hayaishi O. (1983): Activation of DNA ligase by poly(ADP-ribose) in chromatin.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3604-3607

Oliver F. J., de la Rubia G., Rolli V., Ruiz-Ruiz C., de Murcia G., Ménissier-de Murcia J. (1998): Importance of poly (ADP-ribose)polymerase and its cleavage in apoptosis: lesson from an uncleavable mutant.

*J. Biol. Chem.* 273: 33533-33539

Oliver F. J., Ménissier-de Murcia J., Nacci C., Decker P., Andriantsitohaina R., Muller S., de la Rubia G., Stoclet J. C., de Murcia G. (1999): Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- $\kappa$ B activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice.

*EMBO J.* 18: 4446-4454

Panzeter P. L., Zweifel B., Malanga M., Waser S. H., Richard M. C., Althaus F. R. (1993): Targeting of histone tails by poly(ADP-ribose).

*J. Biol. Biochem.* 268: 17662-17664

Petersen J., Dandri M., Bürkle A., Zhang L., Rogler C. E. (1997): Increase in the frequency of hepadnavirus DNA integrations by oxidative DNA damage and inhibition of DNA repair.

*J. Virol.* 71: 5455-5463

Pieper A. A., Brat D. J., Krug D. K., Watkins C. C., Gupta A., Blackshaw S., Verma A., Wang Z.-Q., Snyder S. H. (1999): Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3059-3064

Poirier G. G., de Murcia G., Jongstra-Bilen J., Niedergang C., Mandel P. (1982): Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3423-3427

Rajewsky M. F., Engelbergs J., Thomale J., Schweer T. (1998): Relevance of DNA repair to carcinogenesis and cancer therapy.

*Rec. Res. Canc. Res.* 154: Springer-Verlag

Rao L. & White E. (1997): Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection.

*Curr. Op. Gen. & Dev.* 7: 52-58

Rawling J. M. & Alvarez-Gonzalez R. (1997): TFIIF, a basal eucaryotic transcription factor, is a substrate for poly(ADP-ribosyl)ation.

*Biochem. J.* 324: 249-253

Realini C. A. & Althaus F. R. (1992): Histone shutteling by poly(ADP-ribosyl)ation.

*J. Biol. Chem.* 267: 18858-18865

Ruscetti T., Lehnert B. E., Halbrook J., Trong H. L., Hoekstra M. F., Chen D. J., Peterson S. R. (1998): Stimulation of DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase.

*J. Biol. Chem.* 273: 14461-14467

Saiki R. K., Gelfand, D. H., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

*Science* 239: 487-491

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

*Science* 230: 1350-1354

Sakai T., Agui T., Muramatsu Y., Yamada T., Matsumoto K. (1993): Dissociation of interleukin-2 production from the cell activation in response to the mitogenic lectin in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells of LEC mutant rats.

*Immunology* 79: 491-497

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989): Molecular Cloning. A Laboratory Manual.

*CBH-Laboratory Press.*

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467

Satoh M. S. & Lindahl T. (1992): Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair.

*Nature* 356: 356-358

Satoh M. S., Poirier G. G., Lindahl T. (1993): NAD<sup>+</sup>-dependent repair of damaged DNA by human cell extracts.

*J. Biol. Chem.* 268: 54580-5487

Schmidt T., Körner K., Karsunky H., Korsmeyer S., Müller R., Möröy T. (1999): The activity of the murine Bax promoter is regulated by Sp1/3 and E-box binding proteins but not by p53.

*Cell death Diff.*: in press

Schreiber V., Molinete M., Boeuf H., de Murcia G., Menissier-de Murcia J. (1992): The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localisation signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity.

*EMBO J.* 11:3263-3269

Schwartz J. L. & Weichselbaum R. R. (1986): The mechanism of 3-aminobenzamide-mediated increases in spontaneous and induced SCEs.

*Basic Life Sci.* 29: 293-304

Scovassi A. I., Mariani C., Negroni M., Negri C., Bertazzoni U. (1993): ADP-ribosylation of nonhistone proteins in HeLa cells: Modification of DNA topoisomerase II.  
*Exp. Cell res.* 206: 177-181

Seeberg E., Eide L., Bjoras M. (1995): The base excision repair pathway.  
*TIBS* 20: 391-397

Sentman C. L., Shutter J. R., Hockenberry D., Kanagawa O., Kormeyer S. J. (1991): Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negativ selection in thymocytes.  
*Cell* 68: 879-888

Shieh W. M., Amé J. C., Wilson M. V., Wang Z.-Q., Koh D. W., Jacobson M. K., Jacobson E. L. (1998): Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse synthesis ADP-ribose polymers.  
*J. Biol. Chem.* 273:30069-30072

Shimizu S., Narita M., Tsukimoto Y. (1999): Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.  
*Nature* 399: 483-487

Simbulan C. M. G., Suzuki M., Izuta S., Sakurai T., Savoysky E., Koijma K., Miyahara K., Shizuta Y., Yoshida S. (1993): Poly(ADP-ribose) polymerase stimulates DNA polymerase alpha by physical association.  
*J. Biol. Chem.* 268: 93-99

Simbulan-Rosenthal C. M., Rosenthal D. S., Hilz H., Hickey R., Malkas L., Applegren N., Wu Y., Bers G., Smulson M. E. (1996): The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of multiprotein DNA replication complex.  
*Biochem* 35: 11622-11633

Simbulan-Rosenthal C. M., Rosenthal D. S., Boulares A. H., Hickey R. J., Malkas L. H., Coll J. M., Smulson M. E. (1998a): Regulation of the expression or recruitment of components of the DNA synthesome by poly(ADP-ribose) polymerase.  
*Biochem.* 37: 9363-9370

Simbulan–Rosenthal C. M., Rosenthal D. S., Iyer S., Boulares A. H., Smulson M. E. (1998b): Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis.

*J. Biol. Chem.* 273: 13703-13712

Simbulan–Rosenthal C. M., Rosenthal D. S., Ding R., Bhatia K., Smulson M. E. (1998c): Prolongation of the p53 response to DNA strand breaks in cells depleted of PARP by antisense RNA expression.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 864-868

Simbulan–Rosenthal C. M., Bassem R. H., Rosenthal D. S., Weaver Z., Coleman a., Luo R., Young H. M., Wang Z. Q., Ried T., Smulson M. E. (1999a): Chromosomal aberrations in PARP<sup>-/-</sup> mice. Genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13191-13196

Simbulan–Rosenthal C. M., Rosenthal D. S., Luo R. Smulson M. E. (1999b): Poly(ADP-ribose) polymerase upregulates E2F-1 promotor activity and DNA pol a expression during early S phase.

*Oncogene* 18: 5015-5023

Sinn E., Muller W., Pattengale P., Tepler I., Wallace R., Leder P. (1987): Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo.

*Cell* 49: 465-475

Smith S., Gariat I., Schnitt A., de Lange T. (1998): Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres.

*Science* 282: 1484-1487

Southern E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

*J. Mol. Biol.* 98: 503-517

Strasser A., Harris A. W., Bath M. L., Cory S. (1990): Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2.

*Nature* 348: 331-333;

Thibodeau J., Gradwohl G., Dumas C., Clairoux-Moreau S., Brunet C., Penning C., Poirier G. G., Moreau P. (1989): Cloning of rodent cDNA encoding the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain and analysis of mRNA levels during the cell cycle.

*Biochem. Cell Biol.* 67: 653-660

Thornberry N. A. & Lazebnik Y. (1998): Caspases: Enemies within.

*Science* 281: 1312-1316

Thornborrow E. C. & Manfredi J. J. (1999): One mechanism for cell type-specific regulation of the bax promotor by the tumor suppressor p53 is dictated by the p53 response element.

*J. Biol. Chem.* 274: 33747-33756

Tibbetts R. S., Brumbaugh K. M., Williams J. M., Sarkaria J. N., Cliby W. A., Shieh S. Y., Taya Y., Prives C., Abraham R. T. (1999): A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53.

*Genes Dev.* 13: 152-157.

Trucco C., Oliver F. J., de Murcia G., Ménissier-de Murcia J. (1998): DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines.

*Nuc. Acids Res.* 26: 2644-2649

Tsujimoto Y., Finger L. R., Tunis J., Nowell P. C., Croce C. M. (1984): Cloning of the chromosomal breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation.

*Science* 226: 1097-1099

Uchida K. & Miwa M. (1994): Poly(ADP-ribose) polymerase: Structural conservation among different classes of animals and its implications.

*Mol. Cell. Biochem.* 138: 25-32



Vander Heiden M. G., Chandel N. S., Schumacker P. T., Thompson C. B. (1999): Bcl-xl prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange.

*Cell* 3: 159-167

van Gool L., Meyer R., Tobiasch E., Czipluch C., Jauniaux J-C., Mincheva A., Lichter P., Poirier G. G., Bürkle A., Küpper J.-H. (1997): Overexpression of human poly(ADP-ribose) polymerase in transfected hamster cells leads to increased poly(ADP-ribosyl)ation and cellular sensitization to  $\gamma$ -irradiation.

*Eur. J. Biochem.* 244: 15-20

Vaux D. L., Cory S., Adams T. M. (1988): Bcl-2 promotes the survival of haemopoietic cells and cooperates with c-myc to immortalise pre-B cells.

*Nature* 335: 440-442

Vaziri H., West M. D., Allsopp R. C., Davison T. S., Wu Y.-S., Arrowsmith C. H., Poirier G. G., Benchimol S. (1997): ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the posttranslational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase.

*EMBO J.* 16:6018-6033

Veis D. J., Sentman C. L., Bach E. A., Korsmeyer S. J. (1993): Expression of Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes.

*J. Immunol.* 151: 2546-2554

Waldmann A. S. & Waldmann B. C. (1991): Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells by an inhibitor of poly(ADP-ribosyl)ation.

*Nucl. Acid Res.* 19: 5943-5947

Wang Z.-Q., Auer B., Stingl L., Berghammer H., Haidacher D., Schweiger M., Wagner E. F. (1995): Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease.

*Genes & Dev.* 9: 509-520

Wang Z.-Q., Stingl L., Morrison C., Jantsch M., Los M., Schulze-Osthoff K., Wagner E. F. (1997): PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis.  
*Genes & Develop.* 11: 2347-2358

Wang X., Ohnishi K., Takahashi A., Ohnishi T. (1998): Poly(ADP-ribosyl)ation is required for p53-dependent signal transduction induced by radiation.  
*Oncogene* 17: 2819-2825

Watson A. J., Askew J. N., Benson R. S. (1995): Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents necrosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but not apoptosis.  
*Gastroenterology* 109: 472-482

Weinfeld M., Chaudhry M. A., Dámours D., Pelletier J. D., Poirier G. G., Povirk L. F., Lees-Miller S. P. (1997): Interaction of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase with radiation-induced DNA strand breaks.  
*Radiat. Res.* 148: 22-28

Wesierska-Gadek J., Schmid G., Cerni C. (1996): ADP-ribosylation of wild-type p53 in vitro: Binding of p53 protein to specific p53 consensus sequence prevents its modification.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 96-102

Wesierska-Gadek J., Wang Z.-Q., Schmid G. (1999a): Reduced stability of regularly spliced but not alternatively spliced p53 protein in PARP-deficient mouse fibroblasts.  
*Cancer Res.* 59: 28-34

Wesierska-Gadek J., Bugajska-Schretter A., Low-Baselli A., Grasl-Kraupp B. (1999b): Cleavage of poly(ADP-ribose) transferase during p53-independent apoptosis in rat liver after treatment with N-nitrosomorpholine and cyproterone acetate.  
*Mol. Carc.* 24: 263-275

Whitacre C. M., Hashimoto H., Tsai M. L., Chatterjee S., Berger S. J., Berger N. A. (1995): Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences.  
*Cancer Res.* 55: 3697-3701

White E. (1996): Life, death, and the pursuit of apoptosis.

*Genes & Dev. 10: 1-15*

Wielckens K. & Delfs T. (1986): Glucocorticoid-induced cell death and poly(ADP-ribosyl)ation: increasing toxicity of dexamethasone on mouse S49.1 lymphoma cells with the poly(ADP-ribosyl)ation inhibitor benzamid.

*Endocrinology 119: 2383-2392*

Yang X., Chang H. Y., Baltimore D. (1998): Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis.

*Science 281: 1355-1357*

Yin C. Knudson C. M., Korsmeyer S. J., Van Dyke T. (1997): Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo.

*Nature 385: 637-640*

Yoshihara K., Tanigawa Y., Koide S. S. (1975): Inhibition of rat liver  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease activity by  $\text{NAD}^{+}$  and poly(ADP-ribose) synthetase.

*Biochem. Biophys. Res. Commun. 59: 658-665*

Yoshihara K., Itaya A., Tanaka Y., Ohashi Y., Ito K., Teraoka H., Tsukada K., Matsukage A., Kamiya T. (1985): Inhibition of DNA polymerase  $\alpha$ , DNA polymerase  $\beta$ , terminal deoxynucleotidyl transferase, and DNA ligase II by poly(ADP-ribosyl)ation reaction in vitro.

*Biochem. Biophys. Res. Commun. 128: 61-67*

Zahradka P. & Ebisuzaki K. (1982): A shuttle mechanism for DNA-protein interactions. The regulation of poly(ADP-ribose) polymerase.

*Eur. J. Biochem. 127: 579-585*

Zauberman A., Flusberg D., Haupt Y., Barak Y., Oren M. (1995): A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene.

*Nucl. Acids Res. 23: 2584-2592*

Zhan Q., Fan S., Bae I., Guillouf C., Liebermann D. A., O'Connor P. M., Fornace A. J.  
(1994): Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis.

*Oncogene 12: 3743-3751*

Zörnig M., Busch G., Beneke R., Gulbins E., Lang F., Ma A., Korsmeyer S., Möröy T.  
(1995): Survival and death of pre-lymphomatous B-cells from N-myc/bcl-2 double transgenic mice correlates with the regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes.

*Oncogen 11: 2165-2174*

# ANHANG

## **Die Inhalte dieser Arbeit sind eingereicht und unter Review in:**

Beneke R., Geisen C., Bauch T., Müller W.-U., Küpper J.-H., Möroy T. (1999): DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to poly(ADP-ribosyl)ation but have different requirements for p53.

*Mol. Cell. Biol.*

## **Die Inhalte der Arbeit wurden auch in Form von Vorträgen und Postern präsentiert:**

Beneke R., Geisen C., Bauch T., Müller W.-U., Küpper J.-H., Möroy T. (1999): DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to poly(ADP-ribosyl)ation but have different requirements for p53.

*10<sup>th</sup> AEK Symposia 1999, DKFZ-Heidelberg, Deutschland*

Beneke R., Geisen C., Bauch T., Müller W.-U., Küpper J.-H., Möroy T. (1999): DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to poly(ADP-ribosyl)ation but have different requirements for p53.

*Keystone Symposia 1999: Apoptosis and programmed cell death; Breckenridge, USA*

## Lebenslauf

Name: Beneke  
Vorname: Ralph  
Geburtsdatum: 23.01.1965  
Geburtsort: Zeven  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

8/71-6/74 Grundschule Gerberstraße Norderstedt  
8/74-6/75 Grund- und Realschule Ottersberg  
8/75-6/84 Ratsgymnasium Rotenburg/W mit Abiturabschluß

### Berufsausbildung:

1/86-12/87 MTA-Schule Bremen/Bremerhaven mit Examensabschluß

### Berufstätigkeit:

1/88-9/90 MTRA im St. Joseph-Stift Bremen

### Universitätsausbildung:

ab WS 90/91 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg mit dem Hauptfach Genetik und den Nebenfächern Mikrobiologie, Biochemie und Immunologie

11/94-11/95 Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philippsuniversität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tarik Mörröy, Thema der Diplomarbeit: "Identifizierung und Analyse retroviraler Integrationsstellen in Lymphomen Moloney Maus Leukämie Virus infizierter Eµ *L-myc* / Eµ *pim-1* doppelt transgener Mäuse".

11/95 Abschluß des Biologiestudiums und Erlangung des Akademischen Grades "Diplombiologe"

ab 1/96 Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie der Universität und Gesamthochschule Essen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tarik Mörröy, Thema der Doktorarbeit: "Untersuchungen zur Apoptose und DNA-Reparatur an Lck-*PARP-DBD* transgenen Mäusen".

Akt. Beschäftigung:

ab 1/96 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Zellbiologie der Universität und Gesamthochschule Essen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tarik Mörröy.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Tarik Möröy gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die volle Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeit.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Möröy möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere sei Bernd Rödel für die Beseitigung diverser EDV-Fallstricke, Holger Karsunky für die Bewältigung der FACS-Probleme und Christoph Geisen für seinen nimmermüden Einsatz in allen Lebenslagen gedankt.

Meinen Eltern möchte ich für die liebevolle Aufopferung und die Ausbildungen meiner Talente danken.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Sabine für deren Liebe, Verständnis und Unterstützung während der Promotionszeit, und last but not least, meinem Bruder Sascha, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „DNA-Reparatur und Apoptose in Thymozyten lck-PARP-DBD transgener Mäuse“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Ralph Beneke befürworte.

Essen, den

(Prof. Dr. Tarik Möröy)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zu Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

(Ralph Beneke)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zu Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

(Ralph Beneke)